

**ANREICHERUNG DER CCA-TRANSFERASE
UND BEITRÄGE ZUM MECHANISMUS DER
ERKENNUNG IHRER tRNA-SUBSTRATE**

Horst Overath

1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553803_0066

ANREICHERUNG DER CCA-TRANSFERASE UND BEITRÄGE
ZUM MECHANISMUS DER ERKENNUNG IHRER tRNA-SUBSTRATE

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von
Horst Overath
aus Nürnberg

München 1972



- | | |
|----------------------|------------------------|
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. F. Lynen |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. H. G. Zachau |

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.1972

Meiner Mutter

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. H. G. Zachau in der Zeit vom September 1969 bis Oktober 1972 ausgeführt.

Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden teilweise veröffentlicht: H. Overath, F. Fittler, K. Harbers, R. Thiele und H. G. Zachau, FEBS Letters 11 (1970) 289

Zeit ist der Raum zu menschlicher Entwicklung.

Karl Marx

1. Einleitung und Problemstellung

Der Ablauf der biologischen Protein-Biosynthese wurde in den letzten Jahren in den Grundzügen aufgeklärt (Übersichts-Referate Ref. 1 - 3). Den Transport der Aminosäuren zum Ort der Proteinsynthese, dem mRNA-Ribosomen-Komplex, besorgen die Transfer-Ribonucleinsäuren. Sie tragen die Aminosäure am 3'-terminalen Nucleotid pA, wobei sie zum überwiegenden Teil mit dessen 3'-Hydroxylgruppe verestert ist (Ref. 4 - 6). Die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen hängen in einer hochspezifischen Reaktion an eine bestimmte tRNA eine ganz bestimmte Aminosäure.

Bei aller Verschiedenheit der Primärstruktur haben doch alle bisher bekannten tRNAs die gleiche Sequenz am 3'-terminalen Ende: pCpCpA. Altman und Smith (Ref. 7) konnten den Vorläufer der tRNA^{Tyr} aus *E. coli* isolieren. Dieses Molekül ist länger als die tRNA^{Tyr} und enthält die pCpCpA-Sequenz, die also schon bei der Transkription entstanden sein muß. Es gibt Hinweise, daß dieser Weg der biologischen Entstehung des pCpCpA-Endes nicht für alle tRNAs gleich ist.

Die Anwesenheit der endständigen Sequenz pCpCpA ist von großer Bedeutung: Fehlt sie ganz oder nur das terminale pA, dann ist die Aminoacylierung der tRNA unmöglich (Ref. 8). Ist aber z. B. die Ribose des terminalen pA leicht modifiziert (Ref. 9), dann ist die Aminoacylierung möglich, wenn auch mit verminderter Geschwindigkeit. Das terminale pA ist auch unabdingbar für die Bindung der tRNA an Ribosomen (Ref. 10 - 14).

Der Einbau von radioaktiv-markiertem NMP in tRNA im zellfreien Säugersystem wurde wahrscheinlich zum ersten Mal im Jahre 1949 von Friedkin und Lehninger (Ref. 15) und anschließend von einer Anzahl anderer Autoren beschrieben (Ref. 16 - 20).

Terminale Addition von AMP an lösliche RNA wurde später in mehreren Laboratorien beobachtet (Ref. 21 - 24).

Milde Alkalibehandlung der RNA zeigte, daß das pA in unmittelbarer Nachbarschaft an eine pCpC-Sequenz angehängt wurde. Spaltete man die ganze pCpCpA-Sequenz ab, dann war das Enzym in der Lage, die drei Nucleotide in

der selben Reihenfolge an die RNA zu hängen (Ref. 17, 22, 25).

Das Enzym erhielt den Namen CCA-Transferase (E. C. 2.7.7.25). Ihr Substrat ist tRNA, deren pCpCpA-Ende teilweise oder vollständig fehlt. Die Reaktionsgleichung lautet:



Inzwischen wurde das Enzym in mehreren Organismen nachgewiesen und teilweise hoch angereichert. Man fand es in E. coli (Ref. 26 - 31), in Hefe (Ref. 13, 32 - 34), in Mäuse-Aszites-Zellen (Ref. 25), Kalbsthymus (Ref. 35), Rattenleber (Ref. 36 - 38), Hühner-Embryo-Leber (Ref. 39), Kaninchenmuskeln (Ref. 40, 41) und Kaninchenleber (Ref. 42). - Die CCA-Transferase scheint also universal verbreitet zu sein. Mukerji und Deutscher (Ref. 43) konnten sie in Rattenleberzellen zudem im Cytoplasma und in Mitochondrien nachweisen.

Die CCA-Transferase aus einem Organismus scheint die tRNAs jedes anderen Organismus mit pC und pA beladen zu können, wenn das pCpCpA-Ende vorher, z. B. mit PDE, abgespalten wurde. Das Enzym aus E. coli, z. B., belädt nicht nur tRNA aus E. coli, sondern auch aus Hefe und Rattenleberzellen (Ref. 27); die CCA-Transferase aus Rattenleber wiederum akzeptiert als Substrat tRNA aus Kalbsleber, Kückenleber, E. coli, Hefe oder Weizenkeimlingen (Ref. 38). Weitere Kreuzversuche sind bei Hurwitz und Bressler für die CCA-Transferase aus Kalbsthymus (Ref. 35) und bei M. P. Deutscher für das Hasenleber-Enzym (Ref. 44) beschrieben. - Bei dieser "Toleranz" der CCA-Transferase gegenüber speziesverschiedener tRNA ist es nicht verwunderlich, daß P. Yot et al. auch die RNA aus dem TYM-Virus, deren Ende der tRNA^{Val} ähnelt, mit pC und pA beladen konnten (Ref. 45).

rRNA, Kalbsthymus-DNA und poly (C) konnten jedoch von hochgereinigter CCA-Transferase aus Kaninchenleberzellen nicht beladen werden (Ref. 44, siehe auch Ref. 38). - Das soll nicht heißen, daß nicht einige Bedingungen erfüllt sein müssen: Fehlt der tRNA das viertletzte Nucleotid oder trägt das Substrat einen Phosphatrest an der 3'-terminalen Hydroxylgruppe, dann ist ein Nucleotid-Transfer nicht möglich.

Die eigentliche Funktion der CCA-Transferase in vivo ist noch nicht aufgeklärt.

Spielt sie die Rolle eines Reparatur-Enzyms, d. h. bessert sie nur die - vielleicht durch ein anderes Enzym - teilweise oder ganz abgespaltene pCpCpA-Sequenz aus oder spielt auch die Rückreaktion eine Rolle, so daß das endständige pA je nach ATP- und PP_1 -Konzentration ab- und angeheftet werden kann? - Beide Fälle deuten an, daß die CCA-Transferase eine bedeutende Funktion für die Regulation der Protein-Biosynthese haben könnte, da die tRNA-Konzentration der Zelle in diesem Prozeß der limitierende Faktor ist (Ref. 46).

Daniel und Littauer (Ref. 14) erhielten bei der Extraktion von tRNA aus Rattenleber hauptsächlich Ketten mit einem 3'-tRNApNpC-Ende. Auch von Kalbsthy-mus ist bekannt, daß ein großer Teil der tRNA an 3'-Ende kein pA besitzt (Ref. 35). Das gleiche gilt auch für Bäckerhefe-tRNA und ist an einigen bestimmten tRNAs untersucht (Ref. 47 - 49). - Der Anteil der tRNA mit fehlendem pA-Terminus scheint bei Hefezellen abzuhängen von den Wachstumsbedingungen (Ref. 50) und von der Wachstumsphase, in der man die Hefe erntet (Ref. 32).

Die Deutung dieser Befunde als Artefakte ist unbefriedigend, selbst wenn z. B. aus E. coli-Zellen alle tRNAs mit komplettem pCpCpA-Ende isoliert werden; denn gerade für diesen Organismus ist bewiesen, daß das terminale pA in vivo in verschiedenen Stoffwechselphasen ab- und angeheftet wird (Ref. 51, 52). Die selbe Entdeckung machten andere Autoren in höheren Organismen (Ref. 50, 53 - 56).

All diese Ergebnisse beweisen, daß der Ab- und Aufbau zumindest eines Teils des pCpCpA-Endes in der Zelle tatsächlich passiert. Über den biologischen "Sinn" dieser Reaktionen und der Rolle, die dabei die CCA-Transferase spielt, ist allerdings noch nichts bekannt.

Einen Beitrag zur Auffindung derjenigen, möglich erweise bei allen tRNAs gleichen Strukturelemente zu leisten, die für die Erkennungsreaktion zwischen der CCA-Transferase und den tRNAs essentiell sind, war eine Aufgabe vorliegender Arbeit. Ein möglichst reines Enzym ist dabei von Vorteil. - Ein Teil der hier beschriebenen Ergebnisse wurde bereits veröffentlicht (Ref. 57).

2. Anreicherung der CCA-Transferase

Im folgenden Text werden zwei, teilweise unterschiedliche Präparationen der CCA-Transferase beschrieben und in Tabelle 1 zusammengefaßt. Weg 2 war als Alternative zu Weg 1 gedacht, wurde aber nicht mehr ausgebaut.

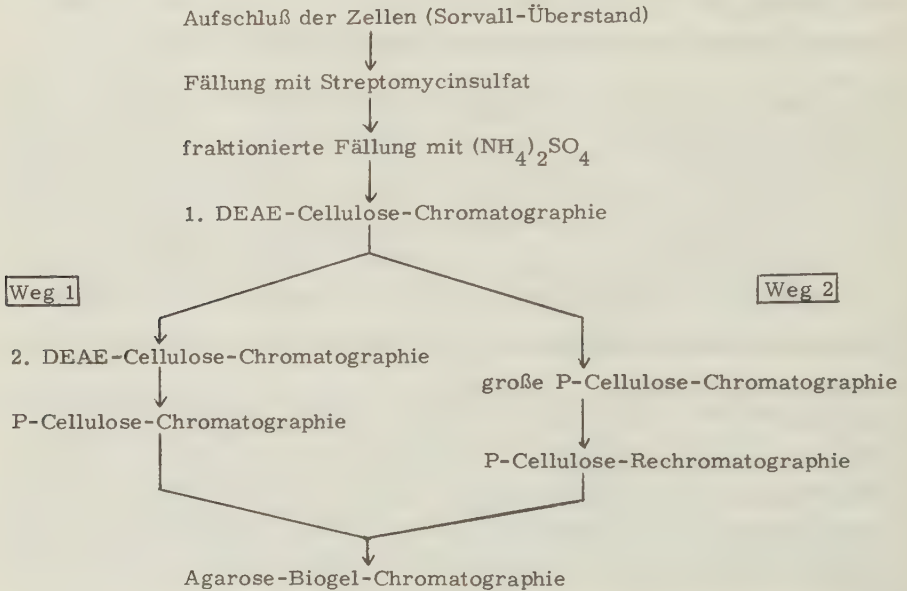


Tabelle 1: Überblick über die beiden zur Enzympräparation eingeschlagenen Wege.

2.1. Ergebnisse

In der Ammoniumsulfat-Fraktion zwischen 45 - 55 % - Sättigung befand sich praktisch die gesamte CCA-Transferase. Die Anreicherung war durchschnittlich 2fach. Die Ausbeute überstieg selten 50 % (siehe Tabelle 2).

2.1.1. Die 1. DEAE-Cellulose-Chromatographie

Abb. 1 zeigt ein für die DEAE-Cellulose-Chromatographie typisches Elutions-

profil: Die überwiegende Menge der CCA-Transferase erschien zusammen mit der Hauptmenge des Proteins. Hier war das Enzym im Durchschnitt 3fach angereichert. Die niedrige CCA-Transferase-Aktivität innerhalb der Begrenzung des Proteingipfels entsprach nicht der tatsächlich vorhandenen Enzymmenge; Aktivitätstests bei niedrigeren Enzymkonzentrationen bewiesen das. Mitunter wurde etwa 10 % der CCA-Transferase auch vor der Hauptproteinmenge eluiert. Sie war dann bis zu 20fach angereichert. Dieser Anteil wurde verschiedentlich gesondert zusammengespült und unter Einsparung einer 2. DEAE-Cellulose-Chromatographie (Ziffer 2.1.2.) bzw. einer großen P-Cellulose-Säule (Ziffer 2.1.3.3.) gleich einer P-Cellulose-Chromatographie im kleinen Maßstab (Ziffer 2.1.3.4.) unterworfen.

Nur bei wenigen DEAE-Cellulose-Chromatographien erschienen zwei Gipfel im Elutionsprofil. Für alle war jedoch eine breite Verteilung der CCA-Transferase typisch. Ähnliche Beobachtungen machten auch J. Preiss et al. (Ref. 26) mit der CCA-Transferase aus *E. coli* beim gleichen Anreicherungsschritt. - In einem früheren Stadium vorliegender Arbeit wurden in einem Fall beide Gipfel getrennt zusammengespült und mit Hilfe der Druckdialyse eingeeengt. Nach Ermittlung derjenigen Enzymmenge beider Konzentrate, die unter gleichen Bedingungen und in gleichen Zeiten gleich große Mengen an CMP in PDE-behandelte tRNA einbaute, ergab sich, daß für sie auch der AMP-Einbau gleich groß war. Damit lag der Schluß nahe, in beiden Gipfeln das gleiche Enzym anzunehmen. Die getrennte Chromatographie beider Konzentrate auf vergleichbaren Sephadex G-100-Säulen ergab eine Elution der CCA-Transferase-Aktivität an verschiedenen Positionen des Profils. Die Frage, ob es sich hierbei um Unter-einheiten der CCA-Transferase in zwei verschiedenen Aggregationszuständen handelte oder aber um CCA-Transferase mit und ohne tRNA komplexiert, wurde nicht weiter verfolgt, da das Enzym in diesem Stadium noch zu wenig angereichert war. Bekannt ist jedenfalls, daß anwesende Nucleinsäuren die 1. DEAE-Cellulose-Chromatographie störend beeinflussen (Ref. 34). Da im Verlauf höherer Anreicherung der CCA-Transferase nie eine Aufspaltung der Aktivität in zwei voneinander getrennte Gipfel gefunden wurde, ist zu vermuten, daß anwesende Nucleinsäuren, aller Wahrscheinlichkeit nach tRNA, einen Komplex mit relativ einheitlichem Molekulargewicht mit der CCA-Transferase zu bilden ver-

mögen. Solch ein Komplex wurde bereits von Hisao Honda zwischen der CCA-Transferase aus *E. coli* einerseits und unfraktionierter tRNA aus *E. coli* und Bäckerhefe andererseits nachgewiesen (Ref. 58).

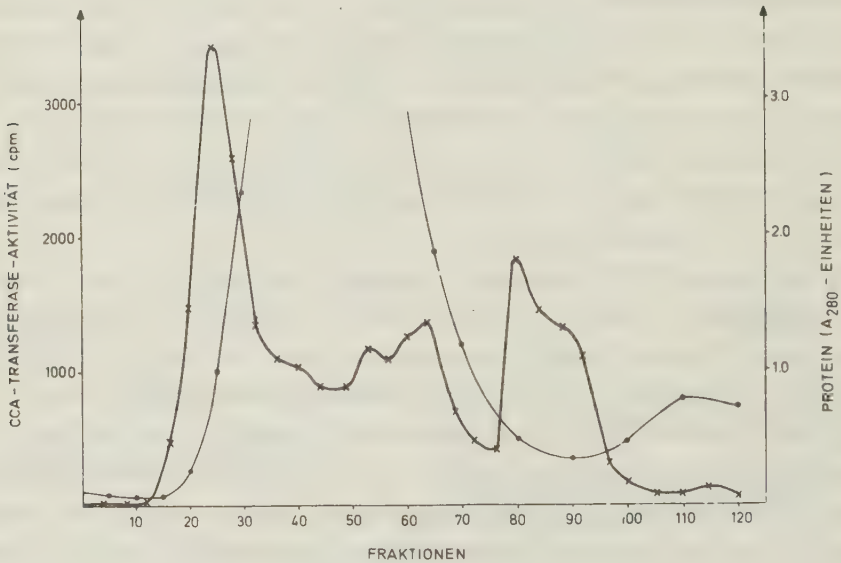


Abb. 1: Elutionsprofil einer 1. DEAE-Cellulose-Säule (12 x 10 cm). Auftragsvolumen: 250 ml; Waschpuffer: 0,03 $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ pH 7,3, 1,0 mM GSH, 0,5 mM EDTA und 10 % Glycerin; Durchschnittsvolumen einer Fraktion: 30 ml; Laufgeschwindigkeit: 350 ml/Std.. Die Konzentration des Proteins (●—●) wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Das Profil der CCA-Transferase-Aktivität (X—X) ergab sich durch Inkubation von je 0,05 ml jeder 8. Fraktion über 20 min unter Standardbedingungen. - Die Fraktionen 16 - 36 (590 ml) und 87 - 105 (740 ml) wurden zusammengespült und getestet (Ziffer 5.8.).

Mit der Absicht, größere Mengen an CCA-Transferase vor die Hauptmenge des Proteins zu ziehen, wurden zwei analytische Säulen unter den oben beschriebenen

nen Bedingungen - eine jedoch bei pH 6,7 - durchgeführt. Die größere Protonen-Konzentration bei pH 6,7 verändert - im Vergleich zu pH 7,3 - den Dissoziationsgrad des Austauschers nur unwesentlich, protoniert jedoch verstärkt das Enzym. Man erwartet deshalb eine noch geringere Affinität der CCA-Transferase zum Austauscher und damit ihre frühere Elution. Das Ergebnis bestätigte die Erwartungen; da aber die Fremdproteine annähernd das gleiche Verhalten wie die CCA-Transferase zeigten, ergab sich kein Vorteil gegenüber dem bisher verwendeten pH.

2.1.2. Die 2. DEAE-Cellulose-Chromatographie

Das Elutionsprofil der 1. DEAE-Cellulose-Chromatographie zeigt, daß die CCA-Transferase unter diesen Bedingungen zusammen mit der Hauptmenge des Proteins eluiert und deshalb kaum angereichert wurde. Es wurde deshalb als zweite basische Chromatographie eine DEAE-Cellulose-Säule nach R.W. Morris et al. (Ref. 33) angeschlossen. Sie beruht auf dem Prinzip, die stark basische CCA-Transferase vom basischen Austauscher DEAE-Cellulose durch extrem niedrige Ionenstärke (0,1 mM) vor allen anderen, weniger basischen Proteinen zu eluieren. Die Anreicherung ergibt sich also nicht durch Konzentration in einem Gipfel, sondern durch Retention von etwa 90 % der Begleitproteine. Die Stabilität des Enzyms in einem Puffer derart geringer Ionenstärke wird durch die Anwesenheit von 40 % Glyzerin einigermaßen gewährleistet.

Diese Säulenchromatographie konnte in nur drei Fällen mit der von den Autoren angegebenen Anreicherung um den Faktor 10 reproduziert werden. Allerdings muß eingeräumt werden, daß sich die Vorgeschichte der aufgetragenen CCA-Transferase-Fraktion dieser Arbeit vornehmlich im Aufschluß der Zellen von der der zitierten Autoren unterschied. Ein typisches Elutionsprofil zeigt Abb. 2.

In der Mehrheit der Fälle wurde das Enzym entweder gar nicht oder nur mäßig angereichert. Die Ursachen hierfür konnten nicht restlos geklärt werden. Das Gelingen der Chromatographie schien von drei Faktoren abzuhängen:

1. Von der Charge des verwendeten Austauschers.
2. Von der Vorgeschichte der aufgetragenen Enzymfraktion.

3. Von der niedrigen Ionenstärke des Puffers und den sich daraus ergebenden pH-Verhältnissen.

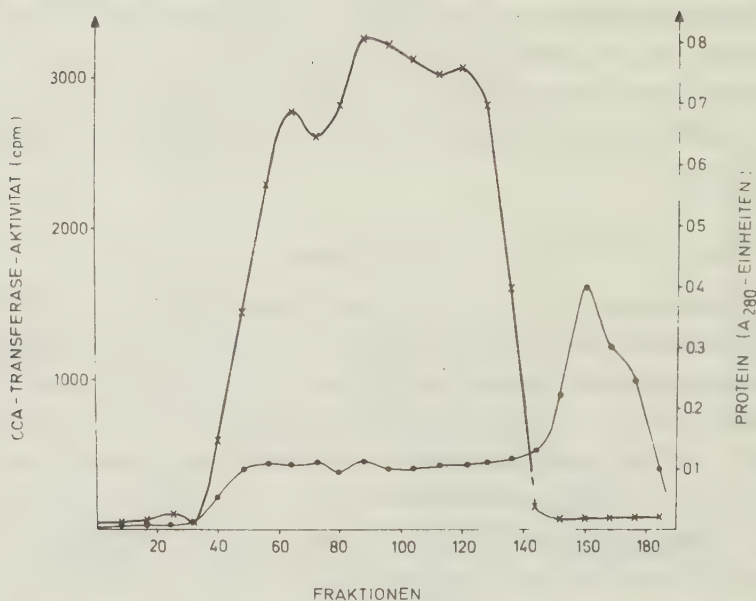


Abb. 2: Elutionsprofil einer 2. DEAE-Cellulose-Säule (12 x 10 cm) (Weg 1). Auftragsvolumen: 1000 ml, 1,0 A₂₈₀-Einheit/ml; Durchschnittsvolumen einer Fraktion: 10 ml; Laufgeschwindigkeit: 200 ml/Std.. Die Proteinmenge (●—●) und die CCA-Transferase-Aktivität (X—X) wurden analog der Legende von Abb. 1 in jeder 8. Fraktion bestimmt. Nach Beendigung des Auftrags (Fraktion 130) wurde mit einem weiteren Puffer (5 mM KH₂PO₄/Tris pH 7,4, 40 % Glyzerin) solange gewaschen, bis keine Enzymaktivität mehr im Eluat zu finden war. - Die Fraktionen 40 - 140 wurden zusammengespült (1000 ml) und getestet.

Zu 1.: Es wurde beobachtet, daß ein und dasselbe Enzym auf der einen DEAE-Cellulose-Charge vollständig deaktiviert wurde, auf einer anderen dagegen - wenn auch meist mit einem schlechten Anreicherungsgrad - eluiert werden konnte. Da der Hersteller der verwendeten DEAE-Cellulose (siehe "Materialien" Zif-

fer 6.) keine Chargenbezeichnung führt, kann nur vermutet werden, daß im zeitlichen Abstand bezogene DEAE-Cellulosen auch zu verschiedenen Zeiten hergestellt wurden und damit keine genau gleiche Vorgeschichte haben.

Zu 2.: Die Enzympräparate zeigten je nach Vorbehandlung mitunter unterschiedliches Verhalten auf vergleichbaren DEAE-Cellulose-Austauschern. Lag der Unterschied zweier Präparate nur in einer durchgeführten bzw. unterlassenen Fällung der Nucleinsäuren mit Streptomycinsulfat nach der Ammoniumsulfat-Fraktionierung, so war das kein ausreichender Grund für eine erfolglose 2. DEAE-Cellulose-Chromatographie.

Zu 3.: Wesentlicher waren wahrscheinlich die undurchsichtigen Verhältnisse an der Oberfläche des Austauschers: Die niedrige Kapazität des Puffers gewährleistete keine pH-Konstanz während der Chromatographie. Verfolgte man den pH schon während der Vorbereitung der Säule, dann war zu beobachten, daß er zwar während des Aufschlämmens der DEAE-Cellulose in konzentriertem Puffer (1,0 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$, pH 7,4) konstant blieb, beim Äquilibrieren mit 0,1 mM Puffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Tris}$, pH 7,4) anfänglich bis unter den Wert von 6,0 fiel und nur nach Waschen mit großen Mengen des gleichen Puffers (bis 80 ml pro cm^3 Austauscher!) langsam auf den gewünschten Wert von pH 7,4 stieg. Die erforderliche Übereinstimmung der Leitfähigkeit von Eluat und Waschpuffer wurde meist schon vorher erreicht. - Trug man nun die Enzymlösung auf, dann stieg mit beginnender Elution des Proteins auch der pH bis auf den Wert 8,0 - 8,2.

Zusammengefaßt traten folgende Fälle auf:

- (a) Enzymaktivität und - in hoher Konzentration - Fremdprotein liefen von Anfang an ohne Auftrennung durch die Säule.
- (b) In einigen Fällen wurde - wie erwartet - von Anfang an die CCA-Transferase eluiert, aber bald danach erschienen auch zusammen mit ihr stetig steigende Mengen an Fremdprotein im Eluat. Eine längere und dünnere Säule, z. B. 6,5 x 40 cm, brachte hier eine bessere Auftrennung. Der sich daraus ergebende zeitlich verlängerte Kontakt zwischen Enzym und Austauscher verminderte jedoch, wahrscheinlich wegen der niedrigen Ionenstärke des Puffers, die Aus-

beute.

(c) Es erschien keine Aktivität im Eluat. In diesen Fällen war sie auch durch Anlegen eines Stufengradienten mit erhöhter Ionenstärke ($0,03 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$) nicht zu eluieren. Das Enzym erlitt offenbar eine irreversible Desaktivierung.

2.1.3. Phosphor-Cellulose-Chromatographie

2.1.3.1. Einleitung

Nach einer Chromatographie an einem basischen Austauschere war es folgerichtig, das Enzym nun einer sauren Chromatographie zu unterwerfen, zumal Vorversuche bereits darauf hingewiesen hatten, daß die CCA-Transferase einen relativ hohen pK-Wert besitzt, an einem Austauscher mit sauren Gruppen also gut festgehalten werden sollte. Ein Vergleich von P-Cellulose, CM-Cellulose und Amberlite (IRC 64) unter den im Vergleich gewählten Bedingungen fiel zugunsten der P-Cellulose aus, obwohl CM-Cellulose keine wesentlich schlechteren Ergebnisse lieferte. Daraufhin wurde für alle weiteren Experimente nur noch P-Cellulose verwendet. Sie hat gegenüber CM-Cellulose außerdem den Vorteil der hohen Kapazität und ist in einem viel kürzeren Zeitraum äquilibrier- und regenerierbar als Amberlite.

Als optimaler pH ergab sich der Wert 6,7. Probesäulen bei pH 7,4 und 6,2 ergaben niedrigere Anreicherungsfaktoren. Die Ausbeute war bei pH 6,7 rund zweimal so groß wie bei pH 6,2. - Bei der Auswahl der Säulengröße wurde auf die jeweils aufzutragende gesamte Proteinmenge und auf optimale Durchflugeschwindigkeit geachtet. - Die P-Cellulose-Chromatographie wurde unter drei verschiedenen Bedingungen durchgeführt:

2.1.3.2. P-Cellulose-Säule im Anschluß an die 2. DEAE-Cellulose-Chromatographie (Weg 1)

Abb. 3 zeigt ein typisches Elutionsprofil. Die CCA-Transferase erschien in einem scharfen Gipfel. Die Ausbeute war meist gut (ca. 80 %), ebenso die Anreicherung (ca. 8fach). Die Säulenmaße wurden im dargestellten Fall etwas

reichlicher gewählt, um die für den Auftrag des großen Volumens benötigte Zeit zu verkürzen, obwohl von der Menge des Proteins her gesehen (ca. 400 A_{280} -Einheiten), eine kleinere Säule ausreichend gewesen wäre. - Anfänglich wurde versucht, die gesammelten Fraktionen der 2. DEAE-Cellulose-Säule direkt (d. h. in 0,1 mM KH_2PO_4 /Tris pH 7,4, 40 % Glyzerin) aufzutragen. Das führte jedoch zu keiner nennenswerten Anreicherung. Auch Versuche in konzentrierterem Puffer (0,025 M KH_2PO_4 /KOH pH 6,7, 40 % Glyzerin) ergaben keine Anreicherung über 5fach. 0,05 M KH_2PO_4 /KOH pH 6,7 schien optimal zu sein: Unter diesen Bedingungen wurde in einem Fall sogar 28fache Anreicherung erlangt.

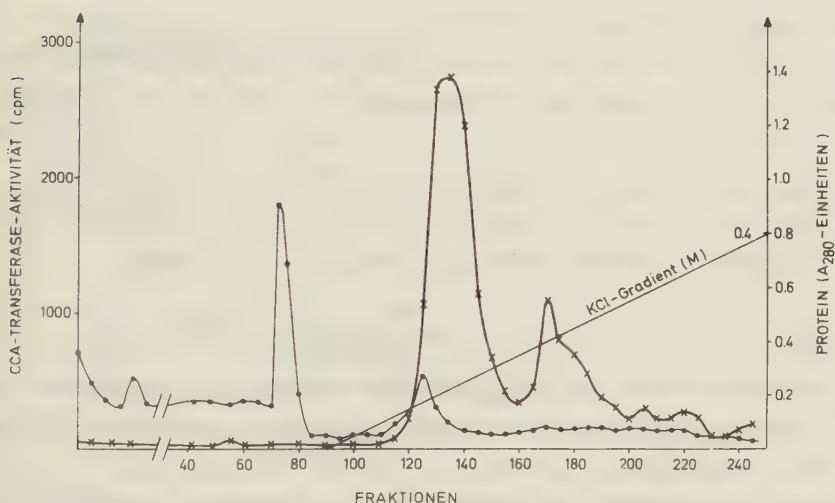


Abb. 3: Elutionsprofil einer P-Cellulose-Säule (5,7 x 11 cm) nach der 2. DEAE-Cellulose-Chromatographie (Ziffer 2.1.2.), (Weg 1). Auftrag: 4000 ml, 0,1 A_{280} -Einheit/ml; Durchschnittsvolumen einer Fraktion: 10 ml (die meisten während des Auftrags gebildeten Fraktionen sind in der Zeichnung weggelassen). Nach Abschluß des Auftrags (Fraktion 60) wurde mit einem weiteren Puffer (0,12 M KH_2PO_4 /KOH pH 6,7, 40 % Glyzerin) bis zur deutlichen Abnahme der Absorption bei 280 nm gewaschen (300 ml) und anschließend (ab Fraktion 90) ein KCl-Gradient von 2 x 750 ml (0,0 - 0,4 M) im selben Puffer angeschlossen. - Die Proteinkonzentration (●—●) und CCA-Transferase-Aktivität (X—X) wurden analog der Legende von Abb. 1 in jeder 5. Fraktion bestimmt. Die Fraktionen 125 - 150 (250 ml) wurden zusammengespült und getestet.

2.1.3.3. P-Cellulose-Chromatographie im Anschluß an die 1. DEAE-Cellulose-Säule (Weg 2)

Wenn das von der 1. DEAE-Cellulose-Säule (Ziffer 2.1.1.) stammende Enzym für die Chromatographie nach dem Schema der 2. DEAE-Cellulose-Säule (Ziffer 2.1.2.) (Weg 1) nicht geeignet oder mit Hilfe von Ammoniumsulfat nicht zu fällen war, weil die durchschnittliche Proteinkonzentration zu gering war (unter $2,0 A_{280}$ -Einheiten pro ml), dann wurden die gesammelten Fraktionen der 1. DEAE-Cellulose-Säule direkt auf eine große P-Cellulose-Säule aufgetragen (Weg 2).

Abb. 4 zeigt ein Elutionsprofil einer solchen P-Cellulose-Chromatographie. Schon während des Auftrags wurden große Mengen an sauren Fremdproteinen abgetrennt. CCA-Transferase-Aktivität erschien jedoch schon beim Waschen mit dem Puffer erhöhter Ionenstärke. Im Gradienten trat sie als breiter Gipfel auf. Der Austauscher war deutlich überladen. Dennoch waren Ausbeute (ca. 60 %) und Anreicherung (bis 9fach) zufriedenstellend, könnten aber gewiß durch Vergrößerung des Austauschervolumens noch verbessert werden.

2.1.3.4. P-Cellulose-Säule als Rechromatographie (Weg 2)

Zur weiteren Anreicherung und Konzentration der vereinigten Fraktionen der P-Cellulose-Chromatographie (Ziffer 2.1.3.3.) wurde eine weitere P-Cellulose-Säule angeschlossen.

Da die CCA-Transferase im Gradienten der vorgeschalteten P-Cellulose-Säule meist in einem breiten Gipfel eluiert wurde, war in den gesammelten Fraktionen eine durchschnittliche KCl-Konzentration von 0,25 M. Sie mußten deshalb verdünnt werden, bis die KCl-Konzentration 0,075 M unterschritt. Daraus ergaben sich zwei Nachteile: Erstens war nun das Auftragsvolumen sehr groß und verzögerte deshalb den zeitlichen Ablauf der Enzym-Präparation. Zweitens muß wahrscheinlich die immer noch relativ hohe Salzkonzentration dafür verantwortlich gemacht werden, daß die CCA-Transferase im Gradienten verschiedentlich in breiter Verteilung eluiert wurde. Der Faktor der Anreicherung lag durchschnittlich um 2,5fach. Die Ausbeute war gut (90 %).

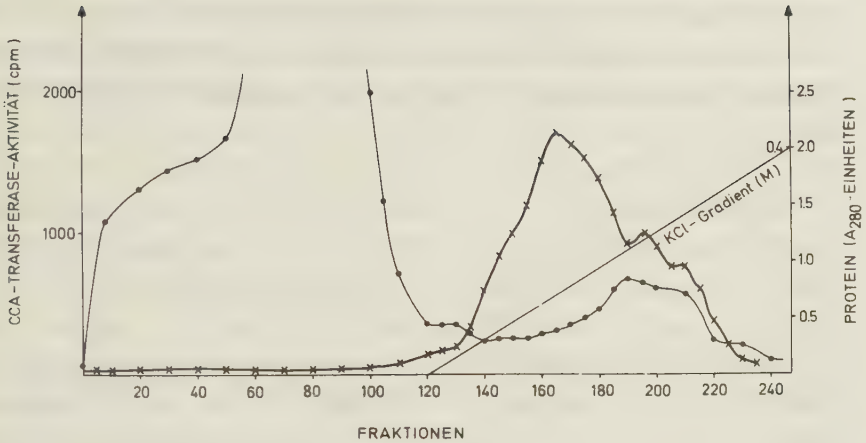


Abb. 4: Elutionsprofil einer P-Cellulose-Chromatographie im Anschluß an eine 1. DEAE-Cellulose-Säule (Ziffer 2.1.1.), (Weg 2). - Säulenmaße: 6,5 x 13 cm; Auftragsvolumen: 2000 ml, 3,5 A₂₈₀-Einheiten/ml; Laufgeschwindigkeit: 250 ml/Std.; Durchschnittsvolumen einer Fraktion: 20 ml während des Auftrags, 15 ml während der Elution. Nach Beendigung des Auftrags (Fraktion 100) wurde mit einem weiteren Puffer (0,12 M KH₂PO₄/KOH pH 6,7, 40 % Glyzerin) bis zur deutlichen Abnahme der Absorption bei 280 nm gewaschen (300 ml) und anschließend (Fraktion 120) ein KCl-Gradient von 2 x 750 ml (0,0 - 0,4 M) im selben Puffer angeschlossen. - Das Protein (●—●) und die CCA-Transferase-Aktivität (X—X) wurden analog der Legende von Abb. 1 bestimmt. Die Fraktionen 140 - 220 (ca. 1200 ml) wurden zusammengefaßt und getestet.

2.1.4. Agarose-Biogel-Chromatographie

Gewisse Begleitproteine der CCA-Transferase zeigen auf basischen und sauren Austauschern ähnliche Eigenschaften und können nur in einer Molekularsieb-Chromatographie abgetrennt werden (Ref. 34). Erfolgreich war dieser Reinigungsschritt jedoch nur dann, wenn schon erhebliche Mengen an Fremd-

protein von der CCA-Transferase abgetrennt waren. - Abb. 5 zeigt ein Elutionsprofil einer Chromatographie auf Agarose-Biogel: Neben der CCA-Transferase erschien ein steiler Gipfel mit Fremdprotein. Die durchschnittliche Anreicherung lag um den Faktor 2. Die Ausbeuten schwankten zwischen 25 und 85 %.

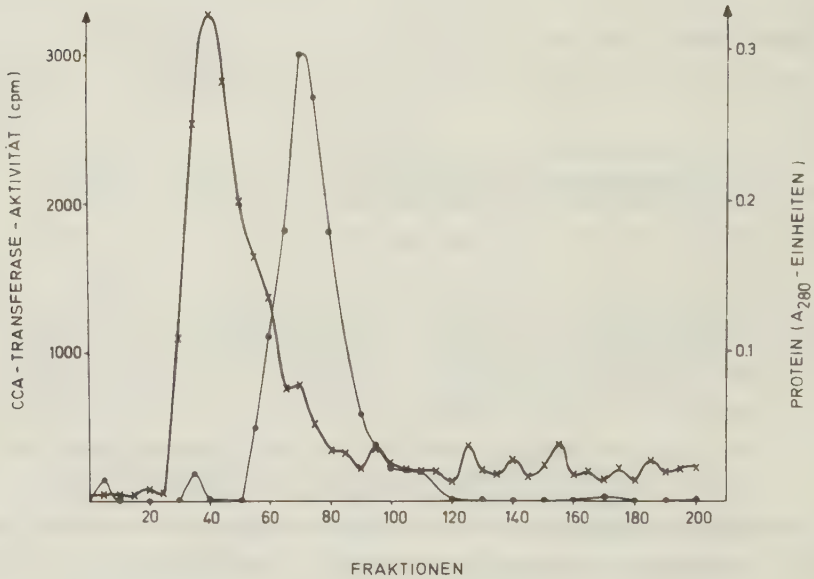


Abb. 5: Elutionsprofil einer Agarose-Biogel-Chromatographie (2,6 x 105 cm). - Auftragsvolumen: 25 ml (0,5 A_{280} -Einheit/ml); anschließend wurde mit Puffer (0,05 M KH_2PO_4/KOH pH 6,7, 40 % Glycerin) gewaschen; Durchschnittsvolumen pro Fraktion: 1,2 ml; Laufgeschwindigkeit: 15 ml/Std.. Bestimmung des Proteins (●—●) und der CCA-Transferase-Aktivität (X—X) analog der Legende von Abb. 1 in jeder 5. Fraktion. Die Fraktionen 30 - 51 (200 ml) wurden gesammelt und getestet.

2.2. Diskussion der Präparation und der Eigenschaften der CCA-Transferase

Die Gesamtanreicherung der CCA-Transferase nach Weg 1 betrug über 530fach,

nach dem Weg 2 etwa 200fach (siehe Tabelle 2). Im folgenden sollen die einzelnen Schritte zur Anreicherung diskutiert werden und - soweit möglich - mit den Präparationen der CCA-Transferase aus Hefe von R. W. Morris et al. (Ref. 33), H. Sternbach et al. (Ref. 34) und der bisher noch unveröffentlichten Präparation von B. Rether et al. (Ref. 59) verglichen werden. Hierfür ist natürlich die Vergleichbarkeit der in dieser Arbeit verwendeten Enzymtestbedingungen mit denen der genannten Autoren eine Voraussetzung. Sie war für R. W. Morris et al. gegeben; d. h. die im Verlauf der hier beschriebenen Präparation erhaltenen Enzymfraktionen mit über 100facher Anreicherung bauten sowohl unter den von R. W. Morris et al. als auch unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen gleiche Mengen an pC in PDE-behandelte tRNA ein. Analoge Vergleiche wurden nicht bezüglich der von den beiden anderen Autoren gewählten Bedingungen angestellt. Da sich jedoch ihre Ionen- und Salzbedingungen nicht wesentlich von denen der vorliegenden Arbeit unterscheiden, sind spezifische Aktivitäten zumindest grob vergleichbar.

1 kg aufgeschlossene Hefezellen lieferte durchschnittlich 30 - 40 Einheiten CCA-Transferase. H. Sternbach et al. und B. Rether et al. fanden 360 E/kg bzw. 80 E/kg. Beide Autoren verwendeten einen Trispuffer (0,2 M, pH 8,4 bzw. 0,1 M pH 7,4). H. Sternbach et al. berichten, daß sie diese hohen Extraktionsausbeuten nicht erhielten, wenn sie einen Phosphatpuffer gleicher Ionenstärke verwendeten. Die Gründe für die desaktivierende Wirkung der Phosphationen auf diesem Stadium der Präparation sind unbekannt. Der von R. W. Morris et al. verwendete Toluolaufschluß bei -40°C führte zu nur etwa 8 E/kg aufgeschlossener Hefe.

Die Ammoniumsulfatfraktionierung führte zu einer relativ schlechten Ausbeute (um 50 %) und Anreicherung (um 2fach). H. Sternbach et al. machten ähnliche Erfahrungen. Es scheint hier der nicht alltägliche Fall vorzuliegen, daß ein Enzym, im Gegensatz zu vielen anderen, durch Ammoniumsulfat und/oder die Fällung unter den gewählten Bedingungen zu einem erheblichen Prozentsatz desaktiviert wird. Berücksichtigt man nämlich die Tatsache, daß nahezu die gesamte CCA-Transferase (98 %) im Bereich von 45 - 55 % Ammoniumsulfat-Sättigung gefunden und rund 80 % des Proteins abgetrennt wurde, dann hätte

Anreicherungsstufe des Enzyms	Gesamtaktivität (E)	Ausbeute (%) +)	Ausbeute (%) ++)	Gesamtprotein (A ₂₈₀ -Einheit)	Abtrennung des Proteins (%) +)	Spez. Aktivität (mE/A ₂₈₀ -Ein- heit)	Anreicherung +) ++)
Sorvall-Überstand	27	100	-	240.000	-	0,00013	1 -
Ammoniumsulfat- Fällung	12	45	45	48.000	80	0,00022	1,7 1,7
1. DEAE-Cellulose- Chromatographie	5	40	19	4.900	85 - 90	0,0006	2,8 4,8
2. DEAE-Cellulose- Chromatographie (Weg 1)	3,8	75	15	500	90	0,0005	9 45
P-Cellulose-Chromato- graphie (Weg 1)	2	50	7,5	48	90	0,039	7 310
große P-Cellulose- Chromatographie (Weg 2)	1,2	60	4,5	480	90	0,006	9 45
P-Cellulose- Rechromatographie (Weg 2)	1,1	90	4	250	50	0,015	2,5 110
Weg 1 Agarose-Biogel- Chromatographie	1,7	85	6,3	23	50	0,066	1,7 530
Weg 2	0,8		3	25		0,026	200

Tab. 2: Daten einer typischen Enzymaufbereitung nach Weg 1 und 2. Gesamtaktivität und Proteinmenge sind auf 1 kg aufgeschlossene Hefe bezogen. (Das $A_{280/260}$ -Verhältnis ist nicht angegeben, da der hohe Glyzeringehalt des Puffers von 40 % in Abhängigkeit von der Charge des Glycerins und vom Säulenmaterial teilweise erheblich zur Absorption bei 260 nm beitrug (bis zu 0,2 A_{260} -Einheiten pro ml). Ähnliche Beobachtungen machten R. W. Morris et al. (Ref. 33), deren Puffer ebenfalls 40 % Glycerin enthielt: Sie fanden bei ihrer reinsten Enzymfraktion ein $A_{280/260}$ -Verhältnis von nur 0,9).

Fußnoten zu Tabelle 2:

+) Jeweils bezogen auf die Säule davor.

++) Jeweils bezogen auf den Sorvall-Überstand.

sich ein Anreicherungsfaktor von 5 ergeben müssen. - Die gleichen Schwierigkeiten wiederholten sich dann bei der Fällung des Proteins in den zusammen-
gespülten Fraktionen der 1. DEAE-Cellulose-Chromatographie (siehe weiter unten).

Die 1. DEAE-Cellulose-Chromatographie ergab durchschnittlich eine Anreicherung um den Faktor 3, obwohl in ihrem Verlauf rund 90 % des Fremdproteins abgetrennt wurden, woraus sich eine Anreicherung um den Faktor 10 hätte ergeben müssen. Ein weiterer Nachteil der Säule ist ihr breites Elutionsprofil, das insofern erstaunlich ist, als die CCA-Transferase ein recht basisches Protein ist und deshalb durch den basischen DEAE-Cellulose-Austauscher nicht so stark reteniert werden sollte. In diesem Schritt wäre es zweifelsohne ratsam gewesen, nicht nur vor der Chromatographie für eine wirksamere Abtrennung oder Zerstörung der Nucleinsäuren zu sorgen, z. B. durch eine Behandlung mit DNase, sondern auch eine weniger dicke, dafür aber längere Säule zu benutzen, um zumindest einen Teil der CCA-Transferase vor

der Hauptmenge des Fremdproteins zu isolieren. Die Aufarbeitung vom Aufschluß der Zellen bis zur 1. DEAE-Cellulose-Chromatographie wurde jedoch von R. Hirsch et al. (Ref. 60) übernommen; die CCA-Transferase war dabei nur ein Nebenprodukt und so konnten die Bedingungen nicht den speziellen Bedürfnissen dieses Enzyms angepaßt werden.

So wurden im allgemeinen - im Gegensatz zu dem in Abb. 1 gezeigten Beispiel - die gesamten, CCA-Transferase enthaltenden Fraktionen zusammengefaßt, um möglichst viel Ausgangsmaterial für die folgenden Säulen zu haben. Das A_{280}/A_{260} -Verhältnis betrug hier etwa 1,4 und deutet auf eine partielle Abtrennung der Nucleinsäuren hin. Darin lag auch die Hauptfunktion dieser Säule. An diesem Punkt teilt sich die Präparation in zwei Wege: Anfänglich wurde das Protein der zusammengespülten Fraktionen der 1. DEAE-Cellulose-Chromatographie unter erheblichem Verlust an CCA-Transferase-Aktivität (45 - 60 %) mit Ammoniumsulfat gefällt und anschließend einer 2. DEAE-Cellulose-Chromatographie unterworfen (Weg 1). Sie erbrachte für eine basische Rechromatographie eine recht erstaunliche Anreicherung um den Faktor 9 - 10, konnte jedoch in nur 3 Fällen reproduziert werden. Nach jeder 1. DEAE-Cellulose-Chromatographie wurde deshalb eine 2. DEAE-Cellulose-Säule in kleinem, analytischem Maßstab ausprobiert: War sie erfolgreich, wurde sie im großen Maßstab wiederholt, wenn nicht, dann wurde Weg 2 eingeschlagen.

Weg 2 war als Alternative zu Weg 1 gedacht, wurde aber nicht mehr ausgebaut und verbessert. Die Ergebnisse jenes Weges zeigen, daß die erste P-Cellulose-Säule noch zu klein gewählt wurde. Außerdem wäre vor der P-Cellulose-Rechromatographie eine weitere basische Säule sinnvoll. - Für die P-Cellulose-Säulen läßt sich unter Berücksichtigung aller verfügbaren Daten feststellen, daß unter den gewählten Bedingungen auch hier eine gewisse Desaktivierung der CCA-Transferase vor sich ging, wenn auch in geringerem Maße als bei der Ammoniumsulfat-Fraktionierung, der 1. DEAE-Cellulose-Säule und der nachfolgenden Fällung des Proteins mit Ammoniumsulfat (Weg 1) zu beobachten war. Neben H. Sternbach et al. konnten auch R. W. Morris et al. Ähnliches feststellen. Es ist daher nicht auszuschließen, daß sich während der Präparation neben aktiver, erhebliche Mengen inaktive CCA-Transferase ansammelte, die

beide gleiche oder ähnliche chromatographische Eigenschaften haben. Diese Erscheinung läßt sich offensichtlich schon durch geringe Mengen Dithiotreitol verhindern: H. Sternbach et al. und B. Rether et al. fügen diese Thioverbindung in geringer Konzentration (0,1 mM bzw. 0,5 mM) ihren Puffern hinzu, können nun ganz auf Glycerin verzichten und erhalten relativ hohe Gesamtausbeuten an CCA-Transferase-Aktivität.

Zuletzt sollen noch einige Eigenschaften einer nach Weg 1 dargestellten, 530-fach angereicherten CCA-Transferase-Präparation beschrieben werden: Die Haltbarkeit des Enzym bei -20°C zusammen mit 40 - 50 % Glycerin ist sehr gut. Auch nach Aufbewahrung über ein halbes Jahr wurde kein Aktivitätsverlust beobachtet. Diese Erscheinung ist praktisch unabhängig vom Grad der Verdünnung und Anreicherung des Enzyms. Einfrieren reinerer Enzympräparationen führte gewöhnlich zu einem leichten Aktivitätsgewinn. Längeres Stehen von Lösungen bei 4°C zeitigte hingegen einen langsamen Verlust an Aktivität. Erscheinungen partieller oder vollständiger Desaktivierung an Ionenaustauschern sind im Text beschrieben.

Tabelle 3 zeigt die Abnahme der Nucleaseaktivität im Verlauf einer CCA-Transferase-Präparation nach Weg 1 auf verschiedenen Anreicherungsstufen. Verglichen mit der Nucleaseaktivität im Rohextrakt ist sie nach der Agarose-Biogel-Chromatographie auf den 430ten Teil gesunken. - Die ATPase- und Pyrophosphatase-Aktivität wurden in der gleichen Enzympräparation im Rohextrakt und nach der Agarose-Biogel-Chromatographie bestimmt und verglichen. Nach dem letzten Anreicherungs-schritt hydrolysierte die einer mE CCA-Transferase entsprechende Proteinmenge 1,2 pMol ATP und 180 pMol PP_i pro min; das bedeutet eine Abnahme um den Faktor 510 bzw. 270 bezogen auf den Rohextrakt.

J. L. Starr et al. (Ref. 40) fanden für die CCA-Transferase aus Rattenmuskeln in Gegenwart von Co^{2+} eine um den Faktor 1,62 höhere Aktivität verglichen mit Mg^{2+} als Cofaktor. - Auf der Suche nach weiteren Cofaktoren neben Mg^{2+} für die CCA-Transferase aus Hefe wurden mehrere, vornehmlich zweiwertige Metallionen der Haupt- und Nebengruppen des Periodensystems in der gleichen

Konzentration wie Mg^{2+} unter Standardbedingungen (Ziff. 5.8.) eingesetzt und die Transferaseaktivität getestet. Mg^{2+} ergab sich mit Abstand als das wirksamste Metallkation.

Anreicherungs- stufe des Enzyms	Eingesetzte CCA- Transferase (mE)	Faktor der An- reicherung	A ₂₆₀ (nach 60 min)	A ₂₆₀ mE	Bruchteil der Nu- clease - Rest-Aktivität bezo- gen auf den Roh- extrakt
Rohextrakt (Sorvall-Überstand)	0,61	1	0,68	1,11	1/1
1. DEAE-Cellulose- Chromatographie	0,75	5	0,05	0,067	1/17
P-Cellulose-Chromato- graphie (Weg 1)	1,2	47	0,03	0,025	1/44
Agarose-Biogel- Chromatographie	85,4	527	0,22	0,0026	1/427

- 21 -

Tabelle 3: Bestimmung der Nuclease-Restaktivität einer nach Weg 1 dargestellten Enzympräparation auf verschie-
denen Anreicherungsstufen (Näheres siehe Methodenteil Ziffer 5.9.). Die Werte der rechten Spalte wur-
den erhalten durch Division von 1,11 durch den zu einer bestimmten Anreicherungsstufe gehörigen Quo-
tienten aus A₂₆₀/mE.

3. Untersuchungen über die Wechselwirkung zwischen tRNA und CCA-Transferase aus Hefe mit Hilfe von Fragmenten von tRNA^{Ser} und tRNA^{Phe}

3.1. Einleitung

Der folgende Teil der Arbeit hatte zum Ziel, Beiträge zum Erkennungsmechanismus der pC- und pA-Beladung von tRNA (PDE) mit Hilfe der CCA-Transferase zu leisten. Erste Vorstöße in dieser Richtung machte J. A. Carbon (Ref. 61): Er behandelte unfractionierte tRNA aus *E. coli* zunehmende Zeiten mit HNO_2 , spaltete anschließend das 3'-terminale Ende mit PDE ab und maß die Beladbarkeit der modifizierten tRNA mit pC und pA in Abhängigkeit der Behandlungsdauer mit HNO_2 . Parallel dazu bestimmte er die Akzeptorfähigkeit für die Aminosäuren ebenso modifizierter, aber nicht PDE-behandelter tRNA. Die Versuche ergaben, daß sowohl die pN - als auch die Aminosäure-Akzeptorfähigkeit der modifizierten tRNA um so mehr abnahm, je länger sie mit HNO_2 vorbehandelt wurde; die Akzeptorfähigkeit für Aminosäuren ging jedoch stets rascher gegen 0 % als die für pN.

Zu dem gleichen Ergebnis kamen T. Lindahl et al. (Ref. 62) und P. Cerutti et al. (Ref. 63). Auch diese Autoren modifizierten die tRNA, T. Lindahl, indem er sie 5 min auf 60° C erhitzte und so denaturierte, P. Cerutti, durch Behandlung mit Natriumborhydrid. In beiden Fällen nahm die Akzeptorfähigkeit für Aminosäuren stärker ab als für pA. J. A. Carbon und P. Cerutti haben nicht durch Sequenzanalyse nachgeprüft, welche Nucleotide der tRNA modifiziert wurden. Ebenso wenig konnte T. Lindahl angeben, wie sich die Tertiärstruktur nativer und denaturierter tRNA unterschied. So war es den genannten Autoren nicht möglich, Vermutungen darüber anzustellen, welche Sequenzbereiche der tRNA für die Erkennung durch die CCA-Transferase essentiell sind und welche nicht. Alle kommen jedoch übereinstimmend zu dem Ergebnis, daß die strukturellen Bedingungen der tRNA für die Aminosäurebeladung mit Aminoacyl-tRNA-Synthetasen wesentlich strenger sind als für die Beladung mit pN durch die CCA-Transferase.

Eine weitere Möglichkeit der gezielten und schrittweisen Veränderung der tRNA ist die Spaltung der Nucleotidkette. Die Spaltung allein und erst recht

fehlende Sequenzbereiche verändern die Tertiärstruktur. - H. J. Gross et al. (Ref. 28) spalteten PDE-behandelte, unfractionierte E. coli-tRNA mit T1-Ribonuclease und testeten die Akzeptorfähigkeit für pA und Aminosäuren in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit der Endonuclease: Je länger die Einwirkung der Nuclease, desto geringer war die Akzeptorfähigkeit der so behandelten tRNA. Die Beladbarkeit mit Aminosäuren nahm wiederum schneller ab als die mit pA.

Während in der eben beschriebenen Arbeit ein Gemisch unfractionierter partialgespaltener tRNA als Substrat diente, wurden in den folgenden Versuchen nur definierte Fragmente gereinigter tRNA eingesetzt. Gezieltes Weglassen immer größerer Teile der tRNA sollte schließlich zu einem Katalog der Sequenzbereiche führen, die für die Erkennbarkeit der tRNA für die CCA-Transferase wesentlich sind. Die Versuche wurden mit zwei Enzymen verschiedener Vorgeschichte und unterschiedlichem Anreicherungsgrad durchgeführt: Die Beladung der beiden von tRNA^{Phe} abgeleiteten Akzeptorfragmente und ihrer Kombinationen erfolgte in einem früheren Zeitraum dieser Arbeit mit einer rund 90fach angereicherten CCA-Transferase (Ziffer 5.7.). - Die Versuche mit den serinspezifischen Akzeptorfragmenten erfolgten vornehmlich mit einer rund 530fach angereicherten CCA-Transferase. Ihre Darstellung ist im Text unter Ziffer 5.1. beschrieben.

Die Prozentangaben des pN-Einbaus beziehen sich jeweils auf die in das betreffende Fragment theoretisch einbaubaren Mengen an pC und pA. - Als Ionen- und pH-Bedingung für den Einbau in die Fragmente wurden diejenigen gewählt, die sich auch für die Beladung ungespaltener, PDE-behandelter und unfractionierter tRNA als optimal erwiesen haben. Die Bedingungen der Präinkubation vor Zugabe der CCA-Transferase haben sich auch bei der Aminoacylierung in unserem Labor bewährt. Die optimale Inkubationstemperatur und ausreichende Inkubationsdauer der pN-Beladung wurde für jedes Akzeptorfragment allein und für dessen Kombination mit einem pG-Fragment gesondert ermittelt.

3.1.1. Beladung von Ser 36 - 82/83 allein und mit verschiedenen pG-Fragmenten kombiniert

3.1.1.1. Einleitung

Die Nucleotidsequenzen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten tRNA^{Ser}_{1,2} aus Brauereihefe klärten H. G. Zachau et al. (Ref. 64) auf. Daneben gibt es noch zwei bis drei minore Spezies, die von J. Kruppa et al. tRNA^{Ser}_{3a, 3b, X} genannt und teilweise identifiziert und isoliert wurden (Ref. 65). - Inkubation der tRNA^{Ser}_{1,2} (PDE) mit CTP, ATP und CCA-Transferase ergab den Einbau von 1,25 Mol pC und 0,5 - 1,0 Mol pA pro Mol tRNA^{Ser}_{1,2}. - Partialsplittings mit T1-RNase an tRNA^{Ser}_{1,2} wurden zum ersten Mal von H.G. Zachau et al. (Ref. 64) beschrieben. Im vorliegenden Fall führte ein Bruch in der Anticodon-schleife zu den Fragmenten Ser 1 - 34 und Ser 36 - 82/83. - Das Fragment Ser 1 - 34 (rund zwei Fünftel der gesamten tRNA) beginnt mit einer 5'-Phosphatgruppe am Nucleotid 1 (G), umfaßt den hU-Stamm, die hU-Schleife und endet mit dem Nucleotid 34 (I). Am 3'-Ende dieses Fragments befindet sich entsprechend der Wirkungsweise der verwendeten Nuclease eine Phosphatgruppe. Das Fragment Ser 36 - 82/83 (rund drei Fünftel der gesamten tRNA) beginnt mit dem Nucleotid 36 (A) der Anticodon-Schleife und umfaßt die S-Region und die T ψ C-Schleife mit den dazugehörigen Stämmen. Rund 75 % des Fragments endet mit dem Nucleotid 83 (C), der Rest mit dem Nucleotid 82 (G). In jedem Fall trägt die 3'-Hydroxylgruppe des endständigen Nucleotids entsprechend der Wirkungsspezifität der PDE keine Phosphatgruppe.

Die folgenden pN-Einbauergebnisse wurden fast ausschließlich mit 530fach angereicherter CCA-Transferase erzielt. Gleiche und ähnliche Versuche wurden schon früher mit 90fach angereicherter CCA-Transferase durchgeführt und teilweise veröffentlicht (Ref. 57). Die Verwendung des reineren Enzyms führte allgemein zu höheren pN-Einbauten. In nur einem Fall ergab sich auch ein qualitativ verschiedenes Ergebnis (Ziffer 3.1.1.2.).

3.1.1.2. pN-Einbau in Ser 36 - 82/83

Zur Ermittlung des Temperaturoptimums des pC- und pA-Einbaus in dieses

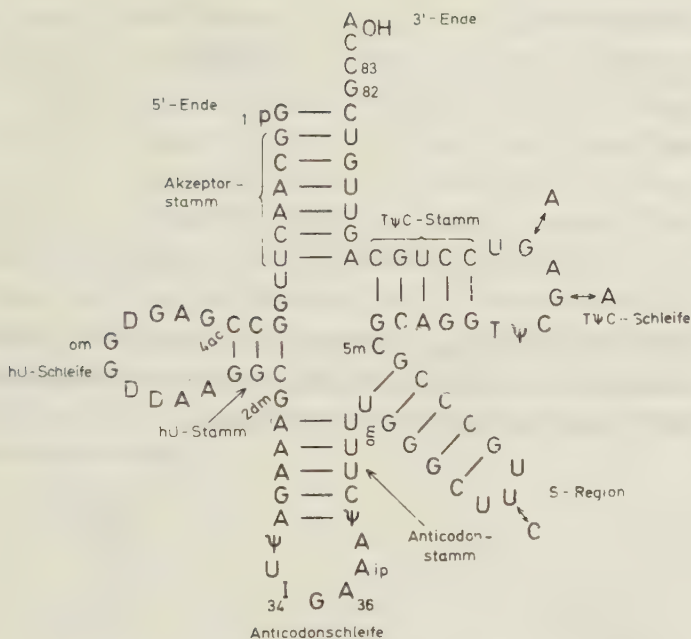


Abb. 6: Kleeblatt der tRNA^{Ser}_{1,2} nach H. G. Zachau et al. (Ref. 64). Die Zahlen bezeichnen die endständigen Nucleotide verwendeter Fragmente.

Fragment wurde unter Standardbedingungen (Ziffer 5.12.) bei 37°, 27°, 17° und 7° C mit 1,0 mE einer rund 530fach angereicherten CCA-Transferase inkubiert und keine Präferenz einer bestimmten Temperatur festgestellt: Der pN-Einbau war in allen Fällen etwa gleich groß. Tabelle 4 gibt den pC-Einbau in Abhängigkeit von der Menge an rund 530fach angereicherter CCA-Transferase wieder. Größere Enzymmengen als 1,0 mE führten zu keinen höheren pC-Einbauten. - Abb. 7 zeigt die Zeitabhängigkeit des pC- und pA-Einbaus in Ser 36 - 82/83 mit rund 530fach angereicherter CCA-Transferase unter den als optimal ermittelten Bedingungen. Auffallend ist, daß der pA-Einbau über dem pC-Einbau liegt. Hierbei handelte es sich um einen mit der verwendeten CCA-Transferase reproduzierbaren Effekt. Der pC-Einbau veränderte sich auch dann nicht in seiner Höhe, wenn ATP im Inkubationsgemisch weggelassen wurde. -

CCA-Transferase (3,0 x mE)	eingebautes pC (pMol)
10^{-3}	0,4
10^{-2}	0,5
10^{-1}	1,7
5×10^{-1}	2,5
1,0	2,4

Tabelle 4: pC-Einbau in 0,012 A_{260} -Einheiten = 26,4 pMol Ser 36 - 82/83 in Abhängigkeit von steigenden Mengen an rund 530fach angereicherter CCA-Transferase nach 60 min bei 20° C.

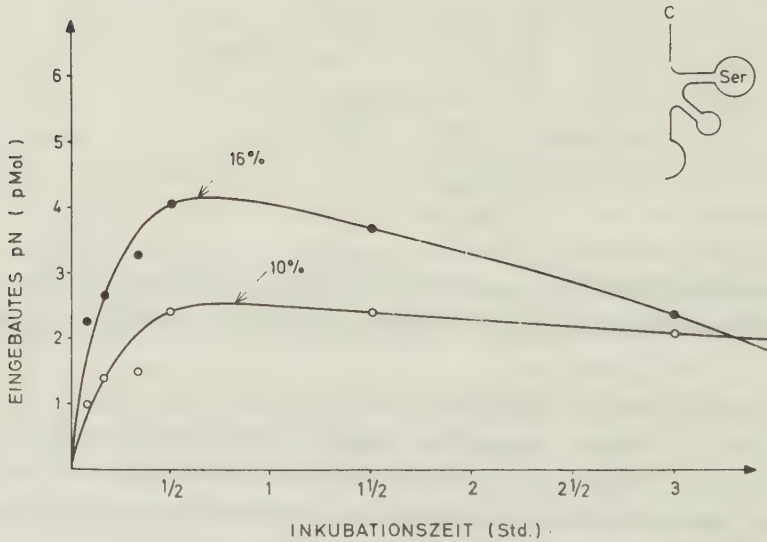


Abb. 7: Zeitabhängigkeit des pC- (o) und pA- (●) Einbaus in 0,012 A_{260} -Einheiten = 26,4 pMol Ser 36 - 82/83. Inkubation bei 20° C mit 1,4 mE einer rund 530fach angereicherter CCA-Transferase unter Standardbedingungen. Nullwert: ohne tRNA-Fragment.

Abb. 8 zeigt jedoch, daß mit einer früher verwendeten, rund 90fach angereicherten CCA-Transferase der pC-Einbau - wie erwartet - über dem pA-Einbau lag. - Tabelle 5 gibt eine zusammenfassende Gegenüberstellung der Einbauergebnisse mit den zwei Enzymen verschiedener Anreicherungsstufe. Abb. 7 zeigt weiter, daß beide Kurven nach rund einstündiger Inkubation ein Maximum erreichten; danach sank der pN-Einbau wieder ab. Dieser Effekt war bei Inkubationstemperaturen zwischen 7° und 37° C gleichermaßen zu beobachten. Er könnte eine Folge der noch in geringerer Menge vorhandenen Nucleaseaktivität sein (siehe Ziff. 3.11.). Inkubationen bei gleichzeitiger Anwesenheit eines erheblichen Überschusses an RNA der Fa. Schwarz (0,5 A₂₆₀-Einheiten), die kein pN akzeptierte, führte jedoch zu keiner Erhöhung der Einbauwerte und zum gleichen Kurvenverlauf.

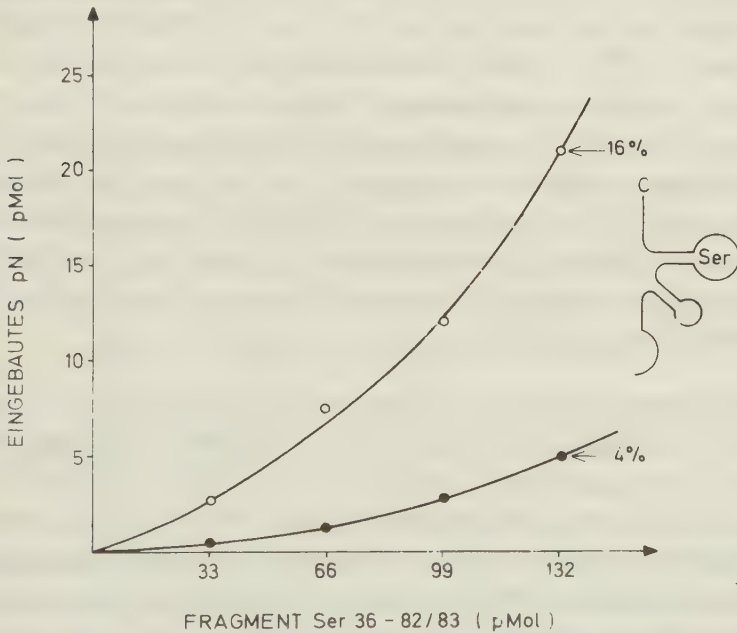


Abb. 8: pC- (o) und pA-Einbau (●) in steigende Mengen Ser 36 - 82/83. - Inkubiert wurde mit 55 μ E einer rund 90fach angereicherten CCA-Transferase bei 20° C und über 60 min. Nullwert: ohne tRNA-Fragment.

CCA-Transferase	% Beladung	
	pC	pA
A	16	4
B	10	16

Tabelle 5: pC- und pA-Einbau in Ser 36 - 82/83 nach 60 min unter Standardbedingungen mit rund 90fach (A) und 530fach (B) angereicherter CCA-Transferase.

3.1.1.3. pN-Einbau in die homologe Kombination Ser 36 - 82/83 und Ser 1 - 34

Chromatographiert man die Fragmente Ser 1 - 34 und Ser 36 - 85 gemeinsam in Gegenwart von Mg^{2+} und ohne Harnstoff auf einem Polyacrylamidgel (Ref. 66), dann entsteht nur eine Bande und zwar in der gleichen Höhe wie die ganze, ungespaltene tRNA^{Ser}_{1,2} (Ref. 67). Vergleicht man weiterhin das optische Verhalten bei 260 nm derselben homologen Fragmentkombination mit dem der ungespaltenen tRNA^{Ser}_{1,2}, so kann man bei differentielltem Schmelzen in beiden Fällen die gleiche Hyperchromizität beobachten. Bei wieder abfallender Temperatur sinkt die UV-Absorption in beiden Fällen auf denselben Endwert (Ref. 68). - Wird schließlich die Kombination Ser 1 - 34 und Ser 36 - 85 mit der entsprechenden Aminoacyl-tRNA-Synthetase inkubiert, dann erhält man bis zu 90 % Serin -Einbau (Ref. 67).

Diese drei Befunde beweisen, daß sich die beiden Fragmente in der "richtigen" Weise zusammenlagern und die entstehende Tertiärstruktur praktisch identisch ist mit der der ungespaltenen tRNA^{Ser}_{1,2}. Abb. 9 zeigt, daß die CCA-Transferase die homolog kombinierten Fragmente zu 100 % mit pC und zu 50 % mit pA zu beladen vermochte. - Die Beladung derselben Fragmentkombination mit nur 90fach angereicherter CCA-Transferase zeigt Abb. 10. Hier wurde eine konstante Menge des Akzeptorfragments mit steigenden Mengen des pG-Fragments "titriert". Auffallend ist die im Vergleich zum oben beschriebenen Versuch geringere Beladung mit pC zu nur 55 %, während die Beladung mit pA in beiden Fällen 50 % betrug.

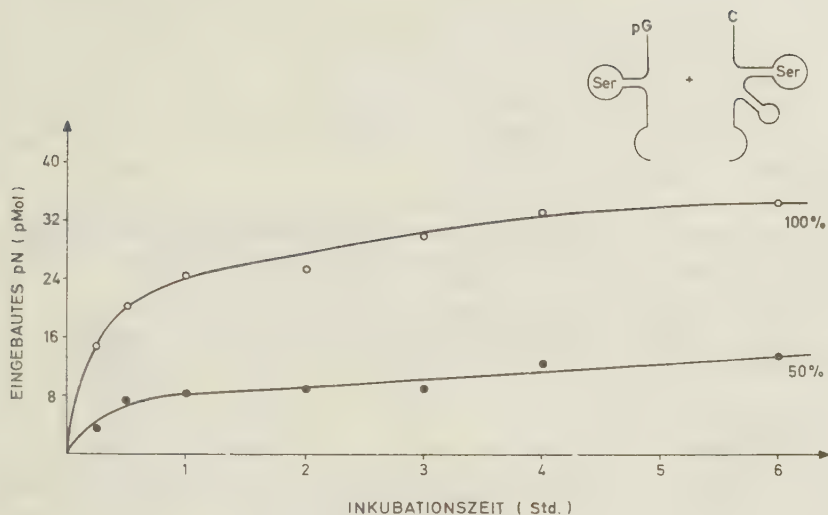


Abb. 9: Zeitabhängigkeit des pC- und pA-Einbaus (offene bzw. geschlossene Symbole) in 0,012 A_{260} -Einheiten = 26,4 pMol Ser 36 - 82/83 in Gegenwart eines dreifachen Überschusses (0,023 A_{260} -Einheiten = 74 pMol) pG-Fragment Ser 1 - 34. - Inkubation bei 20°C mit 1,45 mE einer 530fach angereicherten CCA-Transferase unter Standardbedingungen. Nullwert: pC- und pA-Einbau in Ser 36 - 82/83 allein.

3.1.1.4. pN-Einbau in die heterologen Kombinationen Ser 36 - 82/83 und Phe 1 - 36 bzw. Phe 1 - 15

Diskelektrophorese und differentielle Schmelzkurven ergaben für die heterologen Partialstücke Ser 36 - 85 und Phe 1 - 36 eine deutliche Assoziation in Lösung (Ref. 68). Die entsprechende Aminoacyl-tRNA-Synthetase vermag diese Fragmentkombination jedoch nicht mit Serin zu beladen. - Tabelle 6 veranschaulicht die Abhängigkeit der pN-Akzeptorfähigkeit von der Inkubationstemperatur mit 90fach angereicherter CCA-Transferase. Der Vorzug niedrigerer Temperaturen ist deutlich sichtbar. - Abb. 11 zeigt die Beladung der heterologen Kombination mit pC und pA: Der pC-Einbau erreichte 45 % während der pA-

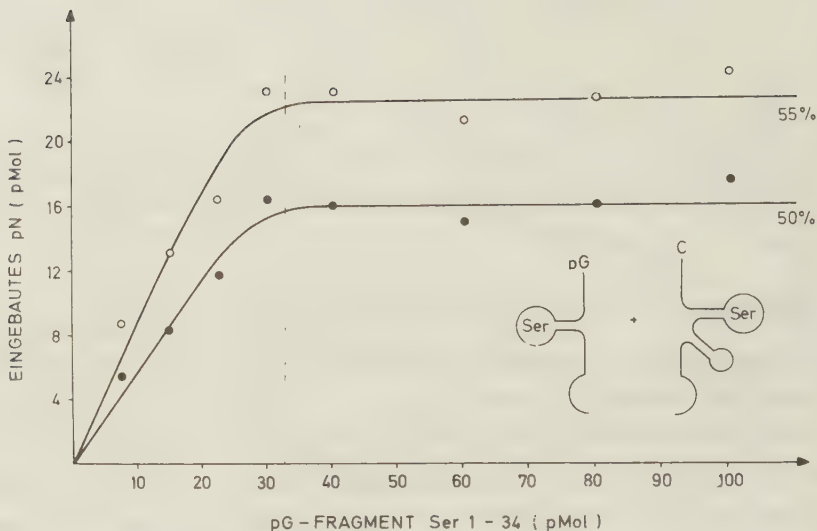


Abb. 10: pC- und pA-Einbau (offene bzw. geschlossene Symbole) in 0,015 A₂₆₀ Einheiten = 33 pMol Akzeptorfragment Ser 36 - 82/83 in Abhängigkeit steigender Mengen pG-Fragment Ser 1 - 34. - Inkubiert wurde bei 20°C 60 min lang mit 0,24 mE einer 90fach angereicherten CCA-Transferase unter Standardbedingungen. Die gestrichelte Linie zeigt den Äquivalenzpunkt: Hier sind beide Fragmente in äquivalenten Mengen vorhanden. Nullwert: pN-Einbau in Ser 36 - 82/83 allein.

Einbau mit rund 6 % recht niedrig war. - Tabelle 6 zeigt dieselbe Reaktion mit nur 90fach angereicherter CCA-Transferase. In diesem Falle ist die Beladungsquote für beide Enzyme recht ähnlich.

Für die nächste heterologe Kombination - Ser 36 - 82/83 und Phe 1 - 15 - existieren zwar keine Diskelektrophoresen und differentiellen Schmelzkurven, aber man kann eine Assoziation der beiden Fragmente unter Ausbildung eines Akzeptorstamms voraussetzen.

Inkubationstemperatur (° C)	Inkubationszeit (min)	% Einbau pC	pA
37	60	0,1	0,0
30	60	10	0,15
25	80	23	2,8
20	80	34	4,5

Tabelle 6: pC- und pA-Einbau in 0,01 A₂₆₀-Einheiten = 22 pMol

Ser 36 - 82/83 und 0,014 A₂₆₀-Einheiten = 40 pMol

Phe 1 - 36 in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur mit Hilfe von 75 µE einer rund 90fach angereicherten CCA-Transferase.

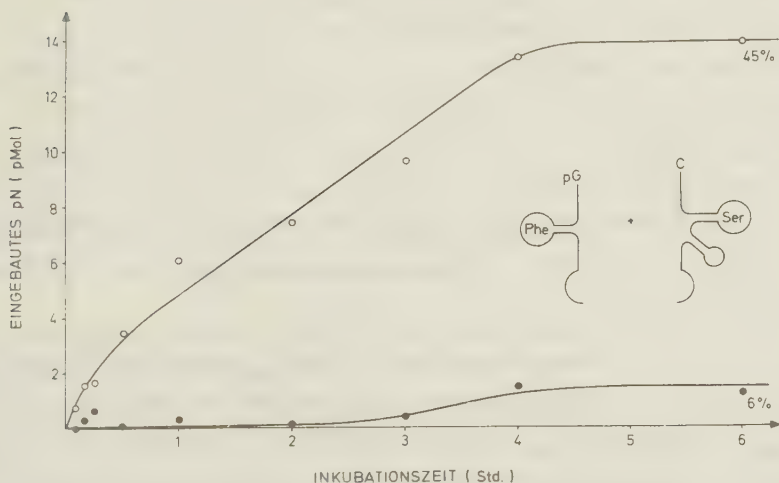


Abb. 11: Zeitabhängigkeit des pC- (o) und pA- (●)Einbaus in 0,012 A₂₆₀-Einheiten = 26,4 pMol Ser 36 - 82/83 in Gegenwart von 0,02 A₂₆₀-Einheiten = 62 pMol Phe 1 - 36. - Inkubation bei 20° C mit 1,43 mE einer rund 530fach angereicherten CCA-Transferase. Nullwert: pC- und pA-Einbau in Ser 36 - 82/83 allein.

In Abb. 12 sieht man den Verlauf des pN-Einbaus bei "Titration" konstanter Mengen Akzeptorfragment mit steigenden Mengen pG-Fragment, diesmal mit nur 90fach angereichertem Enzym. Mit einem reinerem Enzym dürften die beiden Plateaus ein wenig höher liegen.

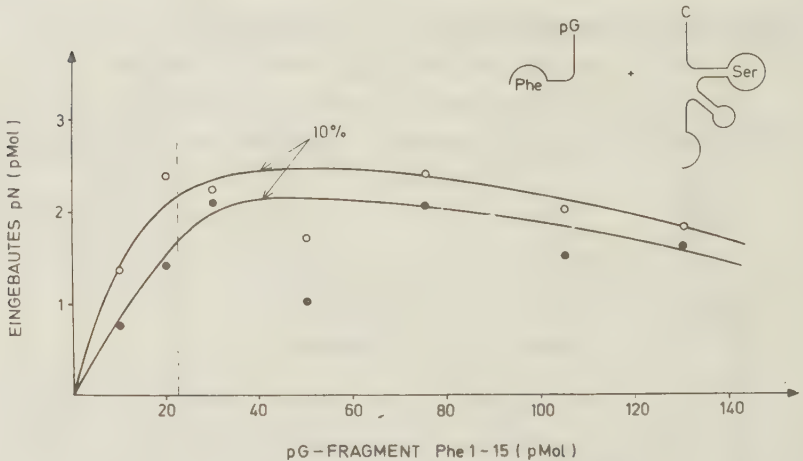


Abb. 12: pC- (o) und pA- (●)Einbau in 0,01 A_{260} -Einheiten = 22 pMol Ser 36 - 82/83 in Gegenwart steigender Mengen Phe 1 - 15. - Inkubation bei 20°C mit 55 μ E einer 90fach angereicherten CCA-Transferrase unter Standardbedingungen. Nullwert: pN-Einbau in das Akzeptorfragment allein.

3.1.2. Beladung zweier von $tRNA^{Phe}$ abgeleiteter Fragmente und deren Kombinationen

3.1.2.1. Einleitung

Die Nucleotidsequenz von $tRNA^{Phe}$ aus Bäckerhefe wurde von U. L. RajBhandary et al. (Ref. 69) aufgeklärt (Abb. 13). - Aus der in der vorliegenden Arbeit verwendeten, aus Brauereihefe angereicherten $tRNA^{Phe}$ kann man eine Base im Anticodon herausspalten. Behandlung des Produkts, $tRNA^{Phe}(HCl)$,

mit Anilin führt zum Angriff der freien Ribose und Abspaltung des 5'-Phosphats. So entstehen zwei Fragmente: Phe 38 - 76, das hier nicht verwendet wurde, und Phe 1 - 36. Es beginnt mit einem 5'-Phosphat am Nucleotid 1 (G), umfaßt die hU-Schleife mit Stamm und endet mit dem Nucleotid 36 (A), dessen 3'-Phosphat mit einem Produkt verestert ist, das aus der freien Ribose durch Behandlung mit Anilin entstanden ist (Ref. 70). - tRNA^{Phe} (HCl) verhält sich bei der Spaltung mit Endonuclease wie die unversehrte tRNA^{Phe} . Spaltung mit Pankreas-RNase liefert das pG-Fragment Phe 1 - 33 mit einem 3'-Phosphat am Nucleotid 33 (U) und das Akzeptorfragment Phe 34 - 74. Beide umfassen jeweils die Hälfte der gesamten tRNA. Pankreas-RNase spaltet also nicht nur in der Anticodon-Schleife, sondern auch am CCA-Ende. Letzteres führt zur Bildung des Dinucleotids CpA. Es verbleibt also eine 3'-Phosphatgruppe am Nucleotid 74 (C) des Akzeptorfragments, das mit Hilfe alkalischer Phosphatase abgespalten werden muß. - Partialsplattung von tRNA^{Phe} (HCl) mit T2-RNase führt zu einem Bruch in der hU-Schleife: Das Fragment Phe 1 - 15 umfaßt nur rund ein Fünftel der tRNA^{Phe} und hat keinen Stamm. Die restlichen vier Fünftel repräsentiert das Fragment Phe 17 - 73, dessen 3'-Phosphatgruppe am Nucleotid 72 (A) dephosphoryliert wurde. Diesem Fragment fehlt damit das ganze pCpCpA-Ende.

Für die folgenden Versuche wurde eine nur rund 90fach angereicherte CCA-Transferase verwendet (Ziffer 5.1. und 5.7.).

Der verschiedentlich zu beobachtende Abfall der pN-Einbaukurven nach Erreichung eines Maximums, wahrscheinlich eine Folge anwesender Nucleasen, fand sich jedoch ausschließlich in den Fällen, wo der Akzeptorstamm des Akzeptorfragments nicht durch ein komplementäres Fragment geschützt war.

3.1.2.2. pN-Einbau in Phe 34 - 74

Der pN-Einbau in Phe 34 - 74, dessen 3'-Phosphat nicht vorher entfernt wurde, lag unter 1 %. Abb. 14 zeigt den pN-Einbau in dephosphorylierte Phe 34 - 74 in Abhängigkeit der Zeit. Schon nach kurzer Zeit wurde das Plateau mit rund 22 % erreicht. Nicht nur diese Kurve, sondern auch Abb. 15, sie zeigt die Abhängigkeit des pC-Einbaus von der Menge des Akzeptorfragments unter den Bedingungen maximalen Einbaus, deutet auf anwesende Nucleasen hin.

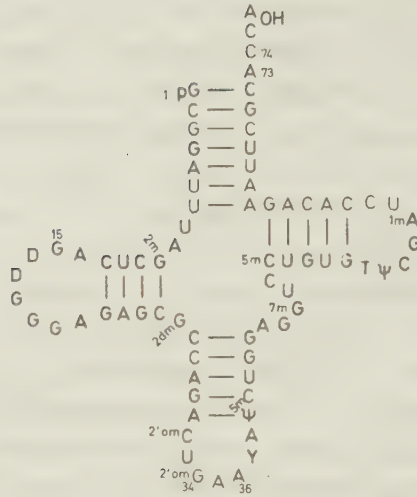


Abb. 13: Kleeblattmodell der tRNA^{Phe} aus Bäckerhefe nach RajBhandary et al. (Ref. 69). Die endständigen Nucleotide der im Text beschriebenen Fragmente sind durch Zahlen gekennzeichnet.

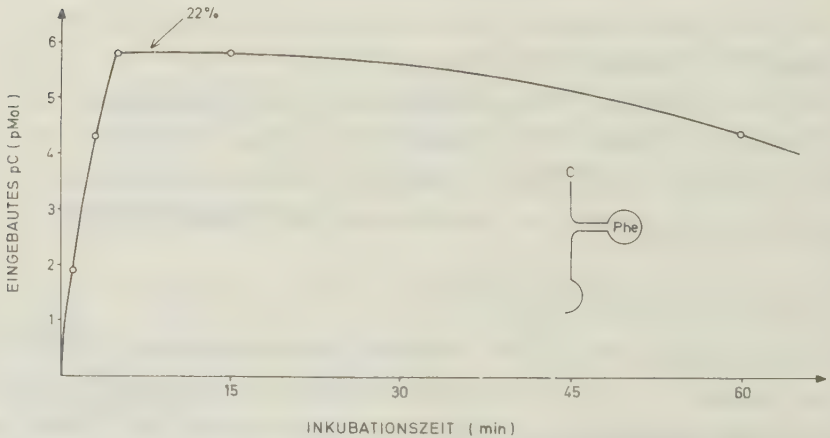


Abb. 14: Zeitabhängigkeit des pC-Einbaus in dephosphorylierte Phe 34 - 74. Jeweils 0,01 A₂₆₀-Einheiten = 26,6 pMol Phe 34 - 74 wurden zu zunehmende Zeiten unter Standardbedingungen bei 37°C mit rund 60 µE einer 90fach angereicherten CCA-Transferase inkubiert. Nullwert: ohne tRNA-Fragment.

Der Kurvenverlauf ist typisch für zwei miteinander in antagonistischer Weise konkurrierende Reaktionen: Bei niedriger tRNA-Fragment-Konzentration fällt die Wirkung der Nuclease stärker ins Gewicht als bei großer; deshalb nähert sich der Kurvenverlauf erst bei hoher Substratkonzentration dem einer Geraden. - In mehreren Anläufen wurde versucht, das Fragment neben pC auch gleichzeitig mit pA zu beladen. Für diese Versuche war charakteristisch, daß die Einbauwerte beider Nucleotide stark streuten, der pA-Einbau im Durchschnitt über dem pC-Einbau lag und maximal 10 % betrug.

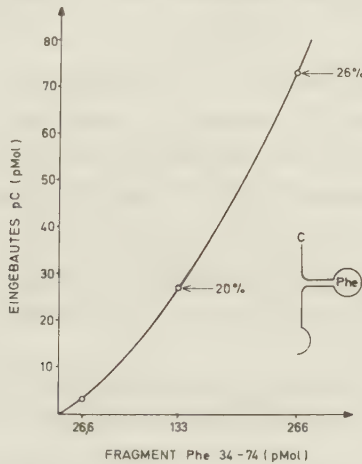


Abb. 15: pC-Einbau in steigende Mengen dephosphorylierte Phe 34 - 74. Inkubiert wurde 40 min bei 37 ° C mit rund 55 μ E einer 90fach angereicherten CCA-Transferase. Nullwert: ohne tRNA-Fragment.

3.1.2.3. pN-Einbau in Phe 34 - 74 mit verschiedenen pG-Fragmenten kombiniert

In der Fragmentkombination Phe 34 - 74 und Phe 1 - 15 kann man - ausgehend vom Kleeblatt-Modell (Abb. 13) - einen ausgebildeten Akzeptorstamm erwarten. Die 4 Nucleotide 10 - 13 des pG-Fragments Phe 1 - 15 finden jedoch keine komplementären Basen vor, so daß sich kein hU-Stamm ausbilden kann. Auch fehlt in dieser Kombination der Anticodonstamm, während der T Ψ C-Stamm im Ak-

zeptorfragment gegeben ist. Abb. 16 zeigt, daß die Einbauwerte für pC bei 30 % und für pA bei 20 % liegen.

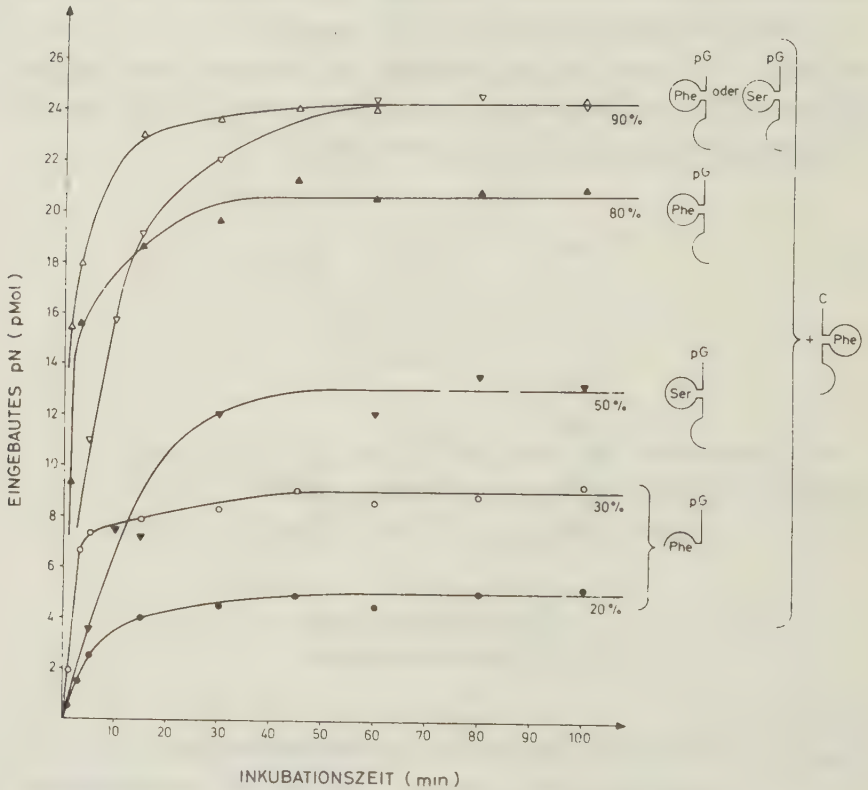


Abb. 16: Zeitabhängigkeit des pN-Einbaus in $0,01 A_{260}$ -Einheiten = 26,6 pMol Phe 34 - 74 mit drei verschiedenen pG-Fragmenten im Überschuß kombiniert. Das Diagramm zeigt den pC- und pA-Einbau (offene bzw. geschlossene Symbole) in die Kombination des Akzeptorfragments mit $0,011 A_{260}$ -Einheiten = 75 pMol Phe 1 - 15 (○, ●), mit $0,02 A_{260}$ -Einheiten = 60 pMol Phe 1 - 36 (Δ, ▲) und mit $0,022 A_{260}$ -Einheiten = 70 pMol Ser 1 - 34 (▼, ▼).

Die homologe Kombination von Phe 34 - 74 und Phe 1 - 36 ergab die erwartete hohe Beladung zu 90 und 80 % mit pC bzw. pA. Interessant ist die gleich hohe Beladung mit pC (und zu immerhin 50 % mit pA) der heterologen Kombination des Akzeptorfragments mit Ser 1 - 34, zumal Disk-Elektrophorese und differentielle Schmelzkurven bewiesen (Ref. 68), daß die beiden Fragmente keine Assoziation eingehen, ganz im Gegensatz zum umgekehrt heterologen Fall Ser 36 - 82/83 und Phe 1 - 36 (Ziffer 3.1.1.4.).

3.1.2.4. pN-Einbau in Phe 17 - 73 allein und mit verschiedenen pG-Fragmenten kombiniert

Bei den folgenden Prozentangaben ist zu berücksichtigen, daß dem Akzeptorfragment Phe 17 - 73 die beiden Cytidine des pCpCpA-Terminus fehlen. Eine Beladung zu 50 % mit pC bedeutet zum Beispiel, daß im Durchschnitt an jedes Fragment ein pC angehängt wurde. - Die Beladung des Fragments Phe 17 - 73 mit phosphorolisiertem 3'-Ende lag unter 2 %. Wurde die endständige Phosphatgruppe mit der alkalischen Phosphatase hydrolysiert, dann konnte eine Beladung zu 35 % mit pC und zu 10 % mit pA beobachtet werden (Abb. 17).

Die homologe Fragmentkombination Phe 17 - 73 und Phe 1 - 36 umfaßt alle tRNA-Schleifen und die dazugehörigen Stämme; da jedoch die Nucleotide 17 - 36 in beiden Fragmenten vorkommen, kann deren Zusammenlagerung auf drei Weisen vor sich gehen. K. Harbers aus unserem Labor unternahm mit zwei Fragmenten geringfügig anderer Länge mannigfache Anstrengungen (u. a. Abbau des Komplexes mit Exonucleasen und anschließende Disk-Elektrophorese des Digest) zu ermitteln, welche der möglichen Strukturen wirklich vorliegt. Die Ergebnisse konnten nur so interpretiert werden, daß alle drei nebeneinander existieren (Ref. 71). In jedem Fall kann man als sicher annehmen, daß die Tertiärstruktur der tRNA zumindest teilweise gestört ist. Die Einbauquote in diese Fragmentkombination betrug dennoch 90 % für pC und 75 % für pA (Abb. 17). Wurde der pN-Einbau in die heterologe Fragmentkombination Phe 17 - 73 und Ser 1 - 34 gemessen (Abb. 17), dann war der pC-Einbau fast ebenso hoch wie im eben beschriebenen homologen Fall, nur der pA-Einbau mit 20 % (anstatt 75 %) war deutlich niedriger. Die in der Legende der Abb. 17 an-

gegebene Inkubationstemperatur wurde jeweils vorher für die homologe und heterologe Fragmentkombination als optimal ermittelt. Tabelle 7 zeigt z. B. die Temperaturabhängigkeit für die heterologe Kombination.

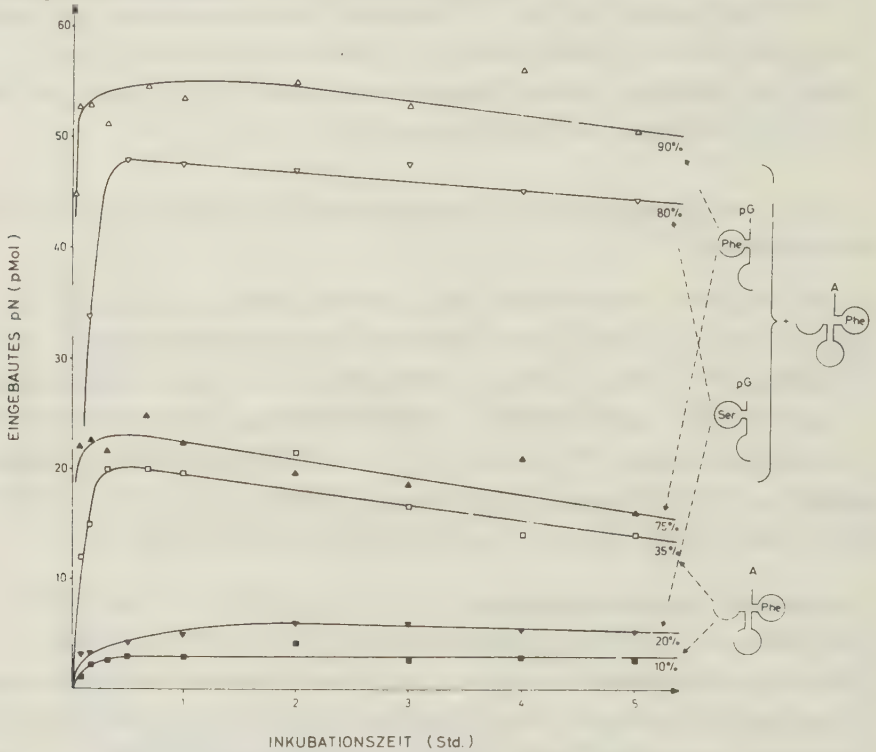


Abb. 17: Zeitabhängigkeit des pN-Einbaus in 0,015 A₂₆₀-Einheiten = 30 pMol dephosphorylierte Phe 17 - 73 allein und mit zwei pG-Fragmenten im Überschuß kombiniert. - Inkubation bei 20° C mit 60 µE einer 90fach angereicherten CCA-Transferase unter Standardbedingungen. Nullwert: Einbau in das Akzeptorfragment allein. - Das Diagramm gibt den pC- und pA-Einbau (offene bzw. geschlossene Symbole) in das Akzeptorfragment allein (□, ■), in dessen homologe Kombination mit 0,02 A₂₆₀-Einheiten = 60 pMol Phe 1 - 36 (△, ▲) und in dessen heterologe Kombination mit 0,02 A₂₆₀-Einheiten = 60 pMol Ser 1 - 34 (▽, ▼) wieder.

Inkubationstemperatur (° C)	Inkubationszeit (min)	% Beladung	
		pC	pA
37	60	0,22	0
30	60	25	3
25	80	44	5
20	80	61	7

Tabelle 7: Temperaturabhängigkeit des pN-Einbaus in 0,01 A₂₆₀-Einheiten = 20 pMol Phe 17 - 73 und 0,008 A₂₆₀-Einheiten = 25 pMol Ser 1 - 34.- Inkubation mit 0,12 mE einer 90fach angereicherten CCA-Transferase unter Standardbedingungen. Nullwert: pN-Einbau in Phe 17 - 73 allein.

Abb. 18 vergleicht den pN-Einbau in die beiden homologen Kombinationen Phe 17 - 73 mit Phe 1 - 15 bzw. Phe 1 - 36 und zeigt, daß sie beide gleich gut beladen werden. Die überlappenden Sequenzbereiche der letzten Kombination machten sich nur durch eine etwas geringere Beladungsgeschwindigkeit bemerkbar.

3.2. Diskussion der Ergebnisse der Beladung der Fragmente mit pC und pA

Die Entdeckung der Synthetase-Erkennungsregion, d. h. derjenigen Bereiche der Sequenzen einer bestimmten tRNA, die durch die entsprechende Aminoacyl-tRNA-Synthetase - und nur durch sie - erkannt werden, ist seit langem das Ziel vieler Forschungsgruppen. Eine der möglichen Annäherungen an das Problem ist das gezielte, schrittweise Weglassen bestimmter Sequenzen der gesamten tRNA und die enzymatische Aminoacylierung der Rest-tRNA. Die Fragmentierung der tRNA wird durch Partialspaltung (im Gegensatz zur Totalspaltung) mit Hilfe chemischer und enzymatischer Methoden bewerkstelligt. So entsteht ein Negativkatalog, in dem die Sequenzen angeführt sind, die für die Erkennung nicht essentiell sind.

Bisher ist es jedoch noch nicht möglich, aus den vielen, teilweise widersprüchlichen Einzelergebnissen allgemein gültige Aussagen über die Synthetase-Er-

kennungsregion zu machen. So ist es keinesfalls sicher, daß nur eine einzige Nucleotidsequenz für die Spezifität verantwortlich ist, denn die Erkennungsregion könnte auch mehrere, in der Primärstruktur nicht zusammenliegende Nucleotidsequenzen, die in der Tertiärstruktur aber vielleicht benachbart sind, enthalten. Auch brauchen die Synthetase-Erkennungsregionen keinesfalls bei allen tRNAs in homologen Bereichen der Sequenz zu liegen.

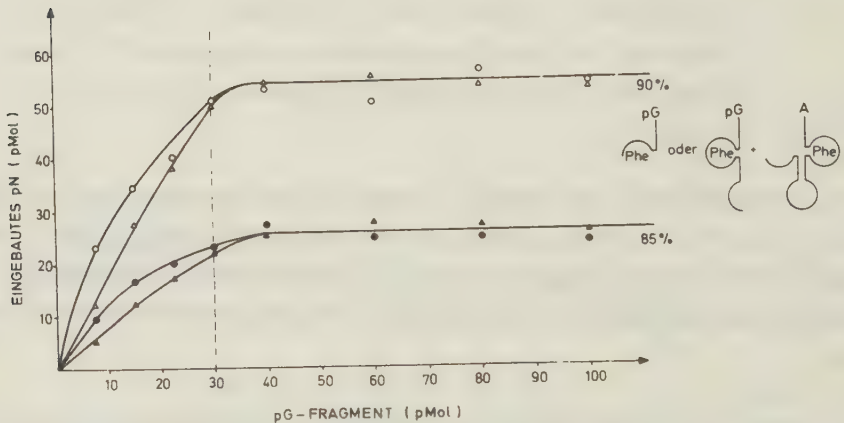


Abb. 18: Beladung einer konstanten Menge Phe 17 - 73 ($0,015 A_{260}$ -Einheiten = 30 pMol) in Gegenwart steigender Mengen zwei verschiedener pG-Fragmente. - Inkubation bei $20^{\circ}C$ in Gegenwart von 0,6 mE 90fach angereicherter CCA-Transferase. Inkubationsdauer: 45 min. Nullwert: pN-Einbau in Phe 17 - 73 allein. Das Diagramm zeigt den pC- und pA-Einbau (offene bzw. geschlossene Symbole) bei Zugabe steigender Mengen Phe 1 - 15 (○, ●) bzw. Phe 1 - 36 (△, ▲). - Die gestrichelte Linie zeigt den Äquivalenzpunkt an, d. h. hier sind Akzeptor- und pG-Fragment in äquimolaren Mengen vorhanden.

Die vorliegenden Versuche verfolgen das gleiche Ziel für die CCA-Transferase, nämlich Beiträge dazu zu leisten, wie dieses Enzym die verschiedenen tRNAs erkennt. Die CCA-Transferase belädt, ganz im Gegensatz zu den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, wahrscheinlich alle tRNAs. Da aber alle tRNAs teilweise erheblich verschiedene Sequenzen und mitunter auch Gesamtlängen haben, ist es unwahrscheinlich, daß bei allen die Tertiärstruktur gleich ist. Das bedingt eine reduzierte Stringenz der Bedingungen für die Erkennung der tRNAs durch die CCA-Transferase verglichen mit der der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen. Mit anderen Worten: Die CCA-Transferase ist "toleranter" als die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen; sie erkennt wahrscheinlich alle tRNAs und nicht nur bestimmte (Ref. 61 - 63).

Tabelle 8 bringt eine Zusammenstellung aller Werte, die beim pC- und pA-Einbau in die verschiedenen Akzeptorfragmente allein und kombiniert erhalten wurden. Im Vergleich dazu sind die Prozentzahlen der Aminoacylierung mit aufgeführt (Ref. 67, 72). Es wird deutlich, daß die Erkennungsbedingungen für die CCA-Transferase wesentlich weniger strenger sind: So vermochte sie sogar Akzeptorhälften von tRNA^{Ser}_{1,2} und tRNA^{Phe} mit pC und pA zu beladen, während diese Fragmente allein bisher nicht aminoacyliert werden konnten. Auffallend ist, daß bei gleichzeitiger Anwesenheit von CTP und ATP die Akzeptorfähigkeit in beiden Fällen für pA höher ist als für pC. Untersuchungen der Temperaturabhängigkeit des maximalen Einbaus in Hälften haben ergeben, daß die Akzeptorfähigkeit zwischen 7° und 37° C praktisch unverändert ist. Niedrigere Inkubationstemperaturen erforderten lediglich längere Zeiten zur Erlangung des immer gleich hohen Plateaus. - Auch Dreiviertel-Möleküle sind beladbar: Phe 17 - 73 akzeptierte zu 35 % pC und 10 % pA, jedoch keine Aminosäure. Lediglich der Komplex aus Phe 34 - 74 und Phe 1 - 15, der zusammen auch eine Dreiviertel-tRNA darstellt, kann zu 2 % aminoacyliert werden; an pC und pA akzeptierte er jedoch 30 bzw. 20 %. - Allgemein läßt sich sagen, daß Dreiviertel-Möleküle mit maximal 35 % pC- und 20 % pA-Einbau nicht wesentlich höher beladbar waren als Hälften allein. Allerdings scheint das zusätzliche Viertel zu einer Stabilisierung der tRNA-Struktur zu führen, denn die Beladung mit pC lag nun grundsätzlich über der mit pA.

pG-Fragmente →			Ser 1 - 34	Phe 1 - 36	Phe 1 - 15
Akzeptorfrag- mente	Ser 36 - 82/83	10/16/0	100/50/90	45/6/0	10/10/0
	Phe 34 - 74	25/- / 0	90/50/0	90/80/55	30/20/2
	Phe 17 - 73	35/10/0	80/20/0	90/85/50	90/85/50

Tabelle 8: Plateauwerte der Beladung aller untersuchten Akzeptorfragmente und deren Kombinationen. Die erste Zahl gibt den pC-, die zweite den pA-Einbau und die dritte die Aminosäure-Akzeptorfähigkeit in Prozenten an.

Weiter zeigt die Tabelle 8, daß die aus zwei Hälften oder aus einem Dreiviertel- und Viertel-Molekül zusammengesetzten Gesamt-tRNAs im homologen Fall erheblich, wenn auch nie zu 100 % aminoacylierbar sind. Die Akzeptorfähigkeit für pC erreichte immer zwischen 90 - 100 %, die für pA dagegen war unterschiedlich und schwankte zwischen 50 - 85 %. - Heterolog kombinierte Hälften konnten bisher nicht aminoacyliert werden, während sie teilweise erhebliche Mengen pC und pA einbauten. Interessant ist dabei, daß diejenigen Kombinationen, die - nach Disk-Elektrophorese und differentielle Schmelzkurve zu urteilen - keine Assoziation in Lösung eingehen, höher beladen wurden als die, die sich zusammenlagern. Besonders auffallend ist das Beispiel des Akzeptorfragments Phe 34 - 74: Der Einbau zu 90 % mit pC ist bei der Kombination mit Phe 1 - 36 und Ser 1 - 34, also im homologen und heterologen Fall, gleich hoch. Der pA-Einbau und die Einbaugeschwindigkeiten (für pC und pA) sind beim letzteren Komplex jedoch deutlich niedriger (vergleiche Abb. 16). Da die beiden genannten heterologen Hälften keine feste Assoziation in Lösung eingehen, muß man annehmen, daß eine womöglich durch das Enzym geförderte, lose Versammlung der beiden Fragmente für die Beladung ausreicht. Das gleiche gilt natürlich auch für die anderen beladbaren Kombinationen von Phenylalanin-spezifischen Akzeptorfragmenten und deren heterologe Kombinationen. Heterologe Kombinationen des Akzeptorfragments Ser 36 - 82/83 bauten überraschenderweise weniger pN ein, obwohl eine feste Assoziation zumindest mit dem Fragment Phe 1 - 36 bewiesen ist.

Die Kombination des Akzeptorfragments Phe 17 - 73 mit der tRNA-Hälfte Phe 1 - 36 führt zu einer Fünfviertel-tRNA mit heraushängenden Sequenzbereichen. Sie ließ sich zu 50 % mit Phenylalanin beladen. Anders die CCA-Transferase: Sie belud diese Kombination genauso gut wie die gerade zu einer Gesamt-tRNA führende Kombination mit Phe 1 - 15. Allerdings war die Beladungsgeschwindigkeit im ersten Fall etwas niedriger (Abb. 18). Noch erstaunlicher ist, daß auch der heterologe Komplex von Phe 17 - 73 mit Ser 1 - 34 fast genauso viel pC akzeptierte, wie der entsprechende Komplex mit dem Akzeptorfragment Phe 34 - 74. Der pA-Einbau mit rund 20 % war jedoch erheblich niedriger. Für alle homologen und heterologen Kombinationen hat sich der Temperaturbereich zwischen 20° und 25° C als optimal ergeben. Niedrigere Inkubationstemperaturen brachten auch bei längeren Zeiten keine Erhöhung des Plateaus.

All diese Versuche gestatten natürlich keine Aussage über distinkte Erkennungsbereiche der tRNAs für die CCA-Transferase. Dafür wurden nicht nur nicht genügend Fragmentkombinationen untersucht, sondern es fehlen auch vergleichbare Daten anderer tRNA-Spezies. Die nachfolgenden Verallgemeinerungen können überdies vorerst nur für die Serin- und Phenylalanin-spezifischen tRNAs aus Hefe gelten, denn die CCA-Transferase-Erkennungsregionen brauchen keineswegs bei allen tRNAs in homologen Bereichen der Sequenz zu liegen.

(1) Bereits tRNA-Hälften haben gewisse, für die CCA-Transferase-Erkennung notwendige Strukturelemente der gesamten tRNA, die eine partielle Beladung ermöglichen.

(2) Zur weiteren Beladung der Akzeptorhälften können nicht nur heterologe, sich assozierende, sondern auch heterologe, sich nicht assozierende pG-Hälften beitragen.

(3) Komplexbildung einer Akzeptorhälfte mit einem homologen, zur Sequenz des Akzeptorstamms also komplementären Viertelfragment führt ebenfalls zur Erhöhung des pN-Einbaus. Der Akzeptorstamm scheint also ein für die CCA-Transferase-Erkennung notwendiges Strukturelement zu sein.

(4) Das gleiche läßt sich ausgehend von den Beladungswerten des Dreiviertel-

Fragments Phe 17 - 73 für den Anticodonstamm sagen.

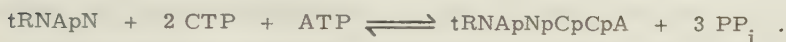
(5) Zwangsläufige Veränderung der Tertiärstruktur der tRNA durch Komplexbildung zweier homologer, durch Spaltung im Anticodonbereich herrührender Hälften beeinträchtigen nicht oder nur wenig die Akzeptorfähigkeit für pC. Hier besteht eine gewisse Analogie zu den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen. Auch für ihren Erkennungsmechanismus ist die Unversehrtheit der Anticodonschleife nicht essentiell.

(6) Gewissen Unregelmäßigkeiten im prozentualen pC/pA-Beladungsverhältnis, das wenig über und erheblich unter 1 liegen kann, könnte darauf hindeuten, daß die Erkennungsregionen für den pC- und pA-Akzeptorschritt nicht identisch sind.

4. Pyrophosphorolyse von tRNA mit Hilfe der CCA-Transferase

4.1. Einleitung

Die CCA-Transferase katalysiert die Reaktion



Die Verschiebung des Gleichgewichts nach links, d. h. die Pyrophosphorolyse von tRNA_{pNpCpCpA}, wurde bald nach der Entdeckung des Enzyms untersucht. So fanden zu Beginn der sechziger Jahre J. Preiss et al. (Ref. 26) und J. J. Furth et al. (Ref. 27) für das Enzym aus E. coli und V. Daniel et al. (Ref. 38) für das aus Rattenleber einen weitgehenden bis vollständigen Abbau der 3'-terminalen pCpCpA-Sequenz mit nur teilweise angereicherten Enzymfraktionen. Ein Ausbau des vierten Nucleotids (pN) wurde nie beobachtet. Die gleiche Reaktion für die CCA-Transferase aus Hefe wurde erst später von verschiedenen Arbeitskreisen untersucht (Ref. 34, 59), aber bisher noch nicht veröffentlicht.

Ein Thema der vorliegenden Arbeit war es, Beiträge zum Mechanismus der Erkennung zwischen der CCA-Transferase und ihren Substraten, den tRNAs, zu liefern. Bisher geschah das unter Zuhilfenahme der Nucleotidyl-Transferase-Aktivität: Das Gleichgewicht oben genannter Gleichung wurde nach rechts verschoben und so tRNA-Akzeptor-Fragmente mit teilweise oder vollständig fehlendem pCpCpA-Ende erneut mit pC und pA beladen. - Nachfolgende Experimente untersuchen die Reaktion in umgekehrter Richtung. Auf diese Weise sollten auch tRNA-Fragmente mit vollständigem pCpCpA-Ende eingesetzt werden können. So würde sich z. B. im Falle von tRNA_{1,2}^{Ser} die Behandlung mit der Exonuclease PDE vor der Partialsplattung (siehe Ziffer 5.13.) erübrigen. Das radioaktiv-markierte Pyrophosphat, ³²P-PP_i, markiert die ausgebauten Nucleotide in der β- und/oder γ-Phosphat-Stellung. Letztere brauchen dann nur noch quantitativ isoliert zu werden. So wird der prozentuale Abbau des pCpCpA-Ende meßbar.

Die ersten Versuche wurden mit einer etwa 90fach angereicherten CCA-Transferase unternommen. Dafür wurden die anscheinend optimalen Inkubationsbedingungen verschiedener Autoren (Ref. 26, 27, 38) ausgewählt und zur Isolierung

rung der ausgebauten, ^{32}P -markierten Nucleotide die Methode von S. A. Berry et al. (Ref. 86) angewandt: Ein gewisser pN-Ausbau konnte verschiedentlich beobachtet, aber nie eindeutig reproduziert werden. - Auch eine mannigfache, systematische Variation der Konzentration der einzelnen Reaktionskomponenten (MgCl_2 , PP_i , GSH, KF), des pH's mit Hilfe verschiedener Puffer und der Bedingungen der quantitativen Absorption der Nucleotide an Aktivkohle brachte kein positives Ergebnis. Deshalb wurden diese Bemühungen vorübergehend eingestellt und erst dann wieder aufgenommen, als ein reineres Enzym vorlag. Die folgenden Versuche wurden mit einer 530fach angereicherten CCA-Transferase durchgeführt und dafür die Inkubationsbedingungen der Vorversuche übernommen (Ziff. 5.14.).

4.2. Ergebnisse

Abb. 19 zeigt, daß bei konstanter Substratkonzentration die gebildete Menge an ^{32}P -NTP nach 45 min ein Plateau erreicht. Im Durchschnitt bildete sich aus unfractionierter tRNA 1 Molekül NTP pro 3 Moleküle tRNA. Mit anderen Worten: Nur der neunte Teil aller Nucleotide der 3'-terminalen pCpCpA-Sequenz wurde abgebaut. Die Menge an gebildetem NTP lag bei Verwendung von nur 0,2 mE CCA-Transferase weit unter diesem Wert. Verdoppelte man jedoch die bei den Experimenten üblicherweise eingesetzte Enzymmenge von 1,0 mE, dann stieg unter sonst identischen Bedingungen die Menge an gebildetem NTP nur unwesentlich an. Durch Kontrollversuche konnte weiterhin gezeigt werden, daß die Enzymaktivität über den gegebenen Inkubationszeitraum nicht wesentlich abnahm. - Die Pyrophosphatase-Restaktivität als begleitende Kontamination war viel zu gering (Ziffer 5.10.), um innerhalb von 45 min den großen Überschuß an radioaktiv-markiertem Pyrophosphat zu hydrolysieren. Sie konnte also nicht für das Plateau verantwortlich gemacht werden. - Abb. 20 veranschaulicht, die lineare Abhängigkeit der Menge an gebildetem ^{32}P -NTP von der tRNA-Menge. - Hänggi et al. (Ref. 73) fanden, daß die Polynucleotid-Kinase nur 20 - 30 % des 5'-terminalen Phosphats der tRNA abzuspalten vermag. War das Plateau erreicht und unterwarf man die tRNA einer reversiblen Denaturierung nach A. Adams et al. (Ref. 74), dann konnten weitere 20 - 30 % der restlichen tRNA dephosphoryliert werden usw.. Hänggi et al. konnte nachwei-

sen, daß hierfür zwei verschiedene Konformationen der tRNA verantwortlich sind, von denen nur eine mit Hilfe der Polynucleotide-Kinase dephosphoryliert werden kann. Die Vermutung, aus dem gleichen Grunde werde auch das 3'-terminale pCpCpA-Ende nicht abgespaltet, hat sich - wie Abb. 21 zeigt - nicht bestätigt.

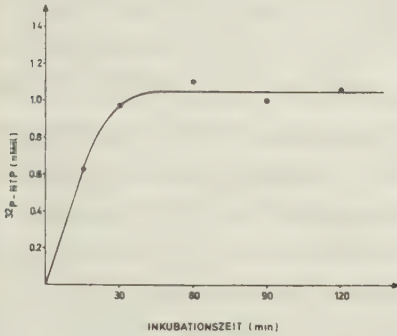


Abb. 19: ^{32}P -NTP-Bildung als Funktion der Zeit. 2,0 A_{260} -Einheiten = 3,0 nMol unfractionierte tRNA aus Brauereihefe wurden zunehmende Zeiten unter Standardbedingungen inkubiert. Nullwert: ohne tRNA.

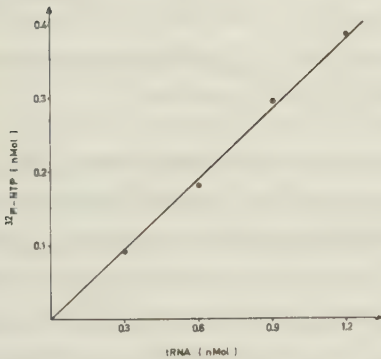


Abb. 20: ^{32}P -NTP-Bildung als Funktion der tRNA-Menge. Steigende Mengen unfractionierter tRNA aus Brauereihefe wurden 70 min unter Standardbedingungen inkubiert. Nullwert: ohne tRNA.

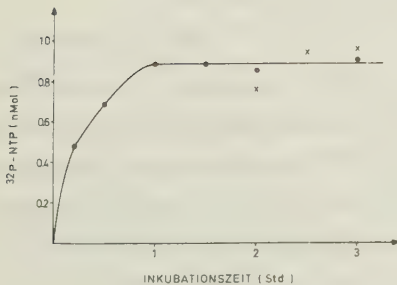


Abb. 21: Vergleich der ^{32}P -NTP-Bildung von tRNA ohne und nach reversibler Denaturierung. 2,0 A_{260} -Einheiten = 3,0 nMol unfractionierte tRNA aus Brauereihefe wurden zunehmende Zeiten unter den Standardbedingungen inkubiert (o). Parallel dazu ein Versuch (X), bei dem die tRNA nach 90 min reversibel denaturiert und mit neuem Enzym weitere 90 min inkubiert wurde.

4.3. Diskussion

In den besprochenen Versuchen betrug der Abbau des pCpCpA-Endes ganzer tRNA durch die CCA-Transferase 1 Molekül pN pro 3 Moleküle tRNA und war damit nur unvollständig. Weniger angereicherte Enzymfraktionen zeigten geringe bis keine Rückreaktion. Einen ebenfalls unvollständigen Abbau beobachteten B. Rether et al. (Ref. 59), obwohl sie annehmen, ein reines Enzym zu haben. Dahingegen fanden Sternbach et al. (Ref. 75) mit fortschreitender Anreicherung der CCA-Transferase einen zunehmenden Abbau des pCpCpA-Endes: Im Rohextrakt war der Abbau praktisch gleich 0, mit einem 2000fach angereicherten, homogenen Enzympräparat dagegen 100 %. - Während also die Nucleotidyl-Transferase-Aktivität schon im Rohextrakt meßbar ist, tritt die umgekehrte Reaktion erst mit zunehmender Reinheit des Enzyms auf. Sternbach et al. fanden außerdem für ihr 2000fach angereichertes Enzym zwischen pH 7,5 und 9 keine Präferenz eines bestimmten pH's für die Abspaltung des pCpCpA-Endes. Die Reaktionsgeschwindigkeit war jedoch um dem Faktor 3 kleiner als die der pN-Transferase-Aktivität. Dahingegen ergaben B. Rethers und die eigenen Untersuchungen ein deutliches pH-Optimum bei pH 7,5. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Abbaureaktion lag etwa um dem Faktor 50 niedriger.

Die Deutung dieser Versuchsergebnisse läßt einen Faktor vermuten, der, fest an die CCA-Transferase gebunden, die Abbaureaktion hemmt, mit fortschreitender Anreicherung abdissoziiert. Die CCA-Transferase könnte also in vivo nur für die pN-Beladung zuständig sein, während ein anderes Enzym, vielleicht eine Nuclease, die Abspaltung des pCpCpA-Endes besorgt. Andererseits ist es ebenfalls denkbar, daß dieser Hemmfaktor reversibel gebunden wird und dadurch Bedeutung für die Regulation der Proteinsynthese hat. (

5. Experimenteller Teil

5.1. Anreicherung der CCA-Transferase

Es soll zuerst die Präparation beschrieben werden, die zu 530facher Anreicherung führte. Bis zu Ziffer 5.4.1. handelt es sich um eine zur Reinigung der Seryl- und Phenylalanyl-tRNA-Synthetasen entwickelten Prozedur von R. Hirsch aus unserem Labor. Die CCA-Transferase war dabei ein zufällig auftretendes Nebenprodukt (Ref. 60).

Die unter Ziffer 5.7. beschriebene, zu einem früheren Zeitpunkt dieser Arbeit entwickelte Prozedur führte zu 90fach angereicherter CCA-Transferase. Sie stammt von R. Hirsch und wurde ebenfalls zum Zwecke der Anreicherung oben genannter Aminoacyl-tRNA-Synthetasen ausgearbeitet. Auch hier war die CCA-Transferase ein Nebenprodukt. In Anbetracht der schlechten Anreicherung und Ausbeute (0,6 - 3,0 %) dieser Prozedur, soll sie unter Ziffer 5.7. nur cursorisch beschrieben werden.

5.2. Aufschluß der Zellen

Zum Aufschluß der Zellen wurden rund 750 gr Hefe mit flüssigem Stickstoff gekühlt, gepreßt (Ref. 85) und in Puffer (0,1 M KH_2PO_4 /KOH pH 7,5, 1,0 mM GSA, 0,5 mM EDTA, 10 % Glyzerin und einige Tropfen 1-Octanol zur Verhinderung von Schaumbildung) aufgenommen. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C ausgeführt. Das Homogenat wurde zentrifugiert (25000 x g, 50 min), der Überstand dekantiert (1500 ml, 90 A₂₈₀-Einheiten/ml) und ein Aliquot davon getestet.

5.3. Streptomycinsulfat- und fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung

Zum Überstand wurde unter ständigem Rühren langsam so viel einer 5 %igen Streptomycinsulfatlösung zugegeben bis die Endkonzentration 1 % betrug. Danach wurde zur quantitativen Fällung der Nucleinsäuren 30 min weitergerührt. - Nach Zentrifugation unter den eben genannten Bedingungen wurde der Überstand bis zur 45 %igen Sättigung unter Umrühren schrittweise mit festem Ammoniumsulfat versetzt und noch 30 min weitergerührt. Danach wurde wie

oben geschrieben zentrifugiert. - Derselbe Arbeitsgang wurde wiederholt, nachdem man vorher den Überstand bis zu 55 % mit festem Ammoniumsulfat gesättigt hatte. Der Proteinniederschlag wurde nun in ca. 250 ml Puffer (0,03 M KH_2PO_4 /KOH pH 7,3, 1,0 mM GSH, 0,5 mM EDTA und 10 % Glyzerin) gelöst und zur weiteren Abtrennung des Ammoniumsulfats 8 Std. lang gegen ca. 7 l des selben Puffers dialysiert.

5.4. Basische Säulen

5.4.1. 1. DEAE-Cellulose-Chromatographie

750 - 800 gr DEAE-Cellulose "DE 52" von Whatman wurden in Puffer (0,03 M KH_2PO_4 /KOH pH 7,3, 1,0 mM GSH, 0,5 mM EDTA und 10 % Glyzerin) aufgenommen, entgast, in eine Säule von 12 cm Durchmesser gefüllt und unter sorgfältiger Kontrolle von pH und Leitfähigkeit äquilibriert. Nach Auftrag der 250 ml dialysierter Enzymlösung wurde mit dem genannten Puffer solange gewaschen, bis keine CCA-Transferase-Aktivität mehr im Eluat zu finden war. -

5.4.2. 2. DEAE-Cellulose-Chromatographie (Weg 1)

Die Säule (12 x 10 cm) wurde entsprechend der Vorschrift von R. W. Morris et al. (Ref. 33) vorbereitet, jedoch der Puffer zur Erhöhung der Pufferkapazität nicht mit KOH, sondern mit Tris eingestellt. Die gesammelten Fraktionen der 1. DEAE-Cellulose-Säule wurden unter Rühren bis zur 60 %igen Sättigung schrittweise mit Ammoniumsulfat versetzt, 30 min weitergerührt und das gefällte Protein zentrifugiert (25000 x g, 50 min). War der Niederschlag in möglichst wenig Puffer (0,1 mM KH_2PO_4 /Tris pH 7,4, 40 % Glyzerin) aufgelöst, konnte die Lösung extensiv gegen den gleichen Puffer dialysiert werden. Dann wurde die Proteinlösung mit weiterem Puffer bis zu einer Konzentration von 1,0 A_{280} -Einheit/ml verdünnt und aufgetragen.

5.5. Saure Säulen

Die Phosphor-Cellulose wurde wie bei E. A. Peterson beschrieben gewaschen (Ref. 76) und zur Aufbewahrung in Puffer (0,05 M KH_2PO_4 /KOH pH 6,7) aufgenommen und bei 4° C gelagert. - Vor jeder Chromatographie wurde der Aus-

tauscher mit obigem Puffer zuerst ohne und dann mit 40 % Glyzerin sorgfältig äquilibriert.

5.5.1. P-Cellulose-Chromatographie im Anschluß an die 2. DEAE-Cellulose-Säule (Weg 1)

Die gesammelten Fraktionen der 2. DEAE-Cellulose-Chromatographie wurden vor Auftrag auf 0,05 M KH_2PO_4 /KOH pH 6,7 und 40 % Glyzerin eingestellt. Wegen des großen Volumens (ca. 4000 ml) nahm der Auftragschritt meist einen ganzen Tag in Anspruch.

5.5.2. P-Cellulose-Chromatographie im Anschluß an die 1. DEAE-Cellulose-Säule (Weg 2)

Die Vorbehandlung der P-Cellulose erfolgte analog Ziffer 5.5.. Die gesammelten Fraktionen der 1. DEAE-Cellulose-Säule wurden direkt auf die P-Cellulose-Säule aufgetragen.

5.5.3. P-Cellulose-Rechromatographie (Weg 2)

Die vereinigten Fraktionen der großen P-Cellulose-Chromatographie wurden mit einer gekühlten Mischung aus doppel destilliertem Wasser und 40 % Glyzerin auf 4000 ml verdünnt, der pH erneut auf den Wert 6,7 eingestellt und auf eine Säule, die entsprechend der Ziffer 5.5. präpariert war, aufgetragen. Die Elution der CCA-Transferase erfolgte analog der Legende von Abb. 4.

5.6. Agarose-Biogel-Chromatographie

Das in voll hydratisiertem Zustand bezogene Biogel A-1,5 m wurde im Puffer (0,05 M KH_2PO_4 /KOH pH 6,7, 40 % Glyzerin) aufgenommen, entgast und in der Säule äquilibriert. Die gesammelten Fraktionen der P-Cellulose-Säulen des Weges 1 bzw. 2 wurden mit Hilfe der Druckdialyse auf mindestens 25 ml eingeengt und dann in der für die Molekularsieb-Chromatographie üblichen Weise aufgetragen.

5.7. 90fache Anreicherung der CCA-Transferase

Rund 1 kg Hefe wurde wie unter Ziffer 5.2. beschrieben aufgeschlossen und der Preßsaft in ca. 1300 ml Extraktionspuffer I (0,016 M K_2HPO_4 , 0,004 M KH_2PO_4 /KOH pH 7,4, 0,002 M $MgSO_4$, 0,001 M GSH) aufgenommen; nach 30 min Rühren wurde 90 min zentrifugiert (80000 x g). - Die fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat wurde analog Ziffer 5.3. durchgeführt. Das gefällte Protein wurde 30 min zentrifugiert (24000 x g) und der Niederschlag in 200 ml Puffer II (0,1 M KH_2PO_4 /KOH pH 7,0, 0,001 M GSH, 0,5 mM EDTA, 10 % Glycerin) aufgenommen und gegen ca. 7 l desselben Puffers 12 Std. dialysiert. Anschließend wurde die Lösung in mit Puffer II äquilibrierter DEAE-Cellulose eingerührt und dabei auf ein Verhältnis von rund 20 gr Absorbens pro 1000 A_{280} -Einheiten Protein geachtet. Die Suspension wurde 10 min zentrifugiert (10000 x g) und der Überstand auf eine Amberlite-Säule (IRC 50, 6 x 45 cm, mit Puffer II äquilibriert) aufgetragen, mit 500 ml Puffer II gewaschen und dann ein Gradient von 2 x 3,3 l (Puffer I: Puffer II, jedoch 0,5 M KH_2PO_4 /KOH pH 7,5) angesetzt. Die zusammengespülten Fraktionen wurden mit Hilfe der Druckdialyse eingeengt (auf ca. 50 ml) und gegen 5 l Puffer III (0,03 M KH_2PO_4 /KOH pH 7,3, 10 % Glycerin) umdialysiert. - Die letzte Chromatographie erfolgte auf einer DEAE-Cellulosesäule (3 x 10 cm), die vorher mit Puffer III äquilibriert wurde. Nach dem Auftrag wurde mit ca. 150 ml Puffer III gewaschen und dann mit einem Gradienten von 2 x 600 ml (Puffer I: Puffer III, zusätzlich 0,02 M NaCl) eluiert. Die CCA-Transferase enthaltenden Fraktionen wurden zusammengespült, mit Hilfe der Druckdialyse eingeengt und bei - 20° C aufbewahrt. - R. Hirsch danke ich für die Überlassung des Enzyms.

5.8. Standard-Enzymtest, Definition der Enzym-Einheit

Nachfolgende Testbedingungen fanden immer dann Anwendung, wenn es um Mengenbestimmung der CCA-Transferase ging, also vornehmlich bei der Enzympräparation. Das Prinzip: Eine konstante Menge unfraktionierte tRNA(PDE) wurde mit steigenden Enzymmengen inkubiert. Während der Inkubation muß Substratüberschuß herrschen. Die zu bestimmende Enzymlösung wurde jeweils so lange verdünnt, bis die Abhängigkeit des pC-Einbaus von der Zeit linear verlief. - 0,1 ml Inkubationsgemisch enthielt folgende Komponenten: 2,0 μ Mol

Glycin/NaOH pH 9,0, 0,1 μ Mol Glutathion, 1,0 μ gr Albumin, 1,5 μ Mol MgCl_2 , 0,01 μ Mol ^3H -CTP (100 C/Mol), 0,1 A_{260} -Einheiten = 150 pMol tRNA (PDE) und steigende Mengen CCA-Transferase. Inkubation bei 37° C 10 min lang. Abbruch der Reaktion mit 5 %iger TCA. Nach 20 - 30 min Stehen wurde die gefällte RNA auf GF/C-Glasfaserfilter mit viel weiterer 5 %iger TCA gespült und gewaschen, die Filter bei 80° C getrocknet, mit 5 ml Toluolszintillator (4 gr Omnifluor pro 1 l über Natrium destilliertem Toluol) versetzt und die Radioaktivität gemessen.

Eine Enzymeinheit ist diejenige Menge an CCA-Transferase, die 1 Mol pC/min unter den genannten Bedingungen einbaut. - Die spezifische Aktivität der 530fach angereicherten Enzymfraktion betrug 0,075 Einheiten CCA-Transferase pro A_{280} -Einheit Protein.

5.9. Bestimmung der ATPase-Aktivität

5,15 nMol γ - ^{32}P -ATP (spez. Aktivität 3180 C/M) wurden unter Standardbedingungen (Ziffer 5.8.), jedoch ohne RNA mit 10 mE CCA-Transferase einer Agarose-Biogel-Chromatographie (Ziffer 2.1.4.) 30 min bei 37° C inkubiert. Die Auftrennung der Reaktionskomponenten erfolgte in einem für Nucleotide geeignetem Lösungssystem auf Standardpapier (2043 b der Firma Schleicher & Schüll): Hierfür wurden 25 ml konzentrierte Ameisensäure mit 5 ml 0,1 M EDTA-Lösung versetzt, mit Ammoniak auf pH 2,7 eingestellt und auf 3 l aufgefüllt. Nun wurde ein bestimmter Bruchteil des Inkubationsgemischs auf das mit dem Lösungssystem getränkte Papier aufgetragen und gleichzeitig rund 80 nMol an nicht markiertem ATP, um eine scharfe ATP-Bande zu erhalten. Nach einer Laufzeit von 60 min bei 3000 V wurde das Papier an der Luft getrocknet und die Verteilung der Radioaktivität mit Hilfe eines Dünnschicht-Scanners verfolgt.

5.10. Bestimmung der Pyrophosphorylase-Aktivität

5,6 nMol ^{32}P - PP_i (1620 C/Mol) wurden unter Standardbedingungen (Ziffer 5.8.), jedoch ohne RNA, mit 0,28 mE CCA-Transferase einer Agarose-Biogel-Chromatographie (530fach angereichert) inkubiert und die Reaktion nach 30 min

durch Kühlung auf 0° C gestoppt. Ein Teil des Inkubationsgemischs wurde dann analog Ziffer 5.9. chromatographiert und analysiert. Durch Zusatz von 2 μ Mol kalten PP_i konnte eine relativ scharfe PP_i -Bande erhalten werden.

5.11. Bestimmung der Nuclease-Aktivität

Die Nuclease-Aktivität wurde auf verschiedenen Stufen der CCA-Transferase-Anreicherung nach K. Takahashi bestimmt (Ref. 77).

5.12. Diskriminierende Beladung von tRNA-Fragmenten mit 3H -CMP und ^{14}C -AMP

Wenn in den Bildlegenden nichts anderes vermerkt, waren in 0,095 ml folgende Komponenten enthalten: 2,0 μ Mol Glycin/NaOH pH 9,0, 0,1 μ Mol Glutathion, 1,0 μ g Albumin, 1,5 μ Mol $MgCl_2$, 0,01 - 0,02 μ Mol 3H -CTP (100 C/Mol), 0,01 μ Mol ^{14}C -ATP (100 C/Mol), um 30 pMol Akzeptor-Fragment und wechselnde Mengen pG-Fragment. - Das Gemisch wurde 1 min auf 70° C erhitzt, 25 - 30 min in ein Wasserbad mit 37° C gestellt und anschließend auf 0° C gekühlt. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe wechselnder Mengen CCA-Transferase mit unterschiedlichem Anreicherungsgrad in 5 μ l und Einstellen in ein Wasserbad. Die Inkubation wurde mit 0,5 ml 5 %iger TCA gestoppt, kurz zuvor jedoch zur quantitativen Fällung der geringen tRNA-Fragmentmengen 0,5 A₂₆₀-Einheiten RNA der Fa. Schwarz hinzugefügt. - Nach etwa 30 min Stehen im Eisbad wurde die RNA auf die übliche Weise (Ziffer 5.8.) auf GF/C-Filtern gebunden und die Radioaktivität gemessen. Die quantitative Auswertung der diskriminierenden Beladung ist bei R. Thiebe (Ref. 78) beschrieben.

5.13. Abspaltung des 3'-terminalen pCpCpA-Endes: tRNA(PDE)

Unfraktionierte tRNA aus Hefe oder angereicherte tRNA_{1,2}^{Ser} wurde bei einer Konzentration von etwa 25 A₂₆₀-Einheiten/ml in 10 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris/HCl pH 7,6, 2 - 3 Stunden mit 15 - 20 Razzell-Einheiten/ml Schlangengift - PDE bei 20° C inkubiert (Ref. 79, 80). Das Protein wurde fünfmal mit Phenol extrahiert. Man schüttelte die vereinigten Phenolphasen zweimal mit Wasser aus und isolierte die tRNA aus den vereinigten wässrigen Phasen durch Ätha-

nolfällung.

5.14. Bestimmung des maximalen pC- und pA-Einbaus in tRNA^{Ser}_{1,2} (PDE)

Die Zusammensetzung des Inkubationsgemisches stimmte mit Ziffer 5.8, bis auf die RNA-Komponente überein. Hier bestand sie aus 0,085 A₂₆₀-Einheiten = 120 pMol tRNA^{Ser}_{1,2} (PDE). Die Bedingungen der Inkubation sind bereits in Ziffer 5.8. beschrieben. Die Inkubationsdauer (etwa 40 min) wurde hingegen so gewählt, daß bei Abbruch der Reaktion das Plateau maximaler Beladung erreicht war.

5.15. Disk-Elektrophorese

Die Disk-Elektrophorese der Fragmente und die Auswertung der Ergebnisse ist wie von P. Philippsen aus unserem Labor beschrieben durchgeführt worden (Ref. 81).

5.16. Pyrophosphorolyse unfractionierter tRNA mit Hilfe der CCA-Transferase

Das Inkubationsgemisch von 0,1 ml enthielt 1 µMol KF, 0,02 µMol GSH, 1,0 µMol 2-Mercaptoäthanol, 0,6 µMol MgCl₂, 4 µMol Tris/HCl pH 7,5, 1,0 µMol ³²P-PP_i (spezifische Aktivität 1 - 2 C/Mol), verschiedene Mengen unfractionierter tRNA (1,0 A₂₆₀-Einheit = 1500 pMol) und 1,0 mE einer rund 530fach angereicherten CCA-Transferase. Nach der Inkubation bei 37° C über wechselnde Zeiten, wurde das Gemisch in Eis gestellt und mit 0,5 ml einer kalten 7 %igen Perchlorsäurelösung, die gleichzeitig 0,02 M an Na₄P₂O₇ war, versetzt. Zur selektiven Absorption des radioaktiv-markierten NTP neben dem großen Überschuß an ³²P-PP_i wurden 1- 2 mg Aktivkohle, die in einer 0,02 M Na₄P₂O₇-Lösung suspendiert war, hinzugefügt. Die Absorption der radioaktiv-markierten Nucleotide war nach 20 min beendet; währenddessen wurde die Kohle mehrfach aufgewirbelt und schließlich mit einer gekühlten Na₄P₂O₇-Lösung (0,04 M) auf ein GF/C-Glasfaserfilter gespült und mit rund 25 ml der gleichen Lösung gewaschen. Das etwa 60 min lang bei 90° C getrocknete Filter wurde in Toluolszintillator (5 ml) im Flüssigkeitsszintillationszähler gezählt.

5.17. Reversible Denaturierung unfractionierter tRNA

Das Standardinkubationsgemisch (Ziffer 5.16.) wurde im Wasserbad 1 min auf 90° C erhitzt, die Zimmertemperatur abgekühlt, ins Eis gestellt und nach Zugabe von weiteren 1,0 mE CCA-Transferase erneut inkubiert.

6. Materialien

Der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* C₈₃₆ wurde von U. Lagerkvist zur Verfügung gestellt, von der Firma Merck, Darmstadt, kultiviert, in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet und bei -80°C gelagert. Er diente für den unter Ziffer 5.2. beschriebenen Aufschluß. - Zu Beginn dieser Arbeit wurde Hefe der Fa. Hackerbräu, München verwendet (siehe Ziffer 5.7.). - Zweifach destilliertes Glyzerin, Serva Entwicklungslabor, Heidelberg, - DEAE-Cellulose "DE 52" und Phosphor-Cellulose, Firma Whatman. - Agarose-Biogel-A-1,5 m, 100 - 200 mesh, Bio-Rad Laboratories, Griffin und Richmond, Calif., USA.

^3H -CTP, ^{14}C -ATP, ^{32}P -ATP und ^{32}P -PP_i, The Radiochemical Centre, Amersham, England. CTP (Tri-Natriumsalz), Firma Boehringer, Mannheim. ATP (di-Natriumsalz), Firma Zellstoff Waldhof. GSH, Firma Merck, Darmstadt. Albumin, Serva Entwicklungslabor, Darmstadt. GF/C-Glasfaserfilter, Whatman. Aktivkohle, Firma Merck, Darmstadt.

6.1. tRNA und tRNA-Fragmente

Unfraktionierte tRNA aus Brauereihefe wurde von der Fa. Boehringer, Mannheim bezogen. Daraus wurden tRNA_{1,2}^{Ser} und tRNA^{Phe} wie bei H.G. Zachau et al. beschrieben von S. Notz aus unserem Labor angereichert (Ref. 64).

Beide tRNAs hatten eine Akzeptoraktivität von 1000 - 1200 pMol Ser bzw. Phe/ A_{260} -Einheit tRNA_{1,2}^{Ser} bzw. tRNA^{Phe}. - Fragmente von tRNA_{1,2}^{Ser} wurden von F. Fittler (Ref. 67) überlassen. 1,0 A_{260} -Einheit entspricht rund 2200 pMol Ser 36 - 82/83 und rund 3200 pMol Ser 1 - 34. Die Zählung der Fragmente beginnt am 5'-Ende. - Die Fragmente von tRNA^{Phe} stammten von K. Harbers (Ref. 72). 1,0 A_{260} -Einheit entspricht 3100 pMol Phe 1 - 36, 7000 pMol Phe 1 - 15, 2640 pMol Phe 34 - 74 und 2020 pMol Phe 17 - 73.

Alle eingesetzten Fragmente waren mindestens 95 % rein. Diese Aussage konnte aufgrund der Ergebnisse der Oligonucleotidanalyse und der analytischen Diskoelektrophorese gemacht werden.

6.2. Enzyme

Phosphordiesterase (E. C. 3.1.4.1) wurde von H. Feldmann aus dem Gift der *Crotalus adamanteus* nach Ref. 82 isoliert. Das verwendete Präparat hatte 450 bzw. 850 Einheiten/ml. Aktivitätstests und Definition der Einheit siehe Ref. 80.

Alkalische Phosphormonoesterase (E. C. 3.1.3.1) aus *E. coli* (Worthington Biochemical Corp., Freehold, N.J., USA) hatte nach Reinigung (Ref. 83) die spezifische Aktivität von 40 Einheiten/mg; Aktivitätstest nach Ref. 84.

7. Apparative Hilfsmittel

Druckdialyse der Firma Amicon N.V., Diaflo Ultrafiltration Membranes PM 30, Den Haag, Holland.

Spektralphotometer PMQ II und PL 4 der Firma Zeiss, Oberkochen. Flüssigkeitsszintillationszähler Tricarb-Modelle 3310 und 3375 der Firma Packard Instruments, Inc., La Grange, Ill., USA.

Dünnschichtscanner Modell LB 2722 der Firma Berthold, Wildungen.

8. Zusammenfassung

Die Präparation der CCA-Transferase erbrachte in zwei Fällen rund 530fache Anreicherung. Das Enzym war zwar nicht homogen, aber für die Beladung der tRNA-Fragmente mit pN genügend rein. - Ein zweiter Weg zur Anreicherung wurde beschrieben, aber nicht weitergeführt.

Die Beladung der Fragmente von tRNA^{Ser}_{1,2} und tRNA^{Phe} mit pC und pA am 3'-terminalen Ende sollte diejenigen Sequenzbereiche und Strukturelemente aufdecken, die für die Erkennung der tRNAs durch die CCA-Transferase notwendig sind. - Etwas über die Hälfte der folgenden Ergebnisse wurden mit einer 90fach, die übrigen mit einer 530fach angereicherten CCA-Transferase erzielt.

Halbe tRNA-Moleküle waren bis zu 25 % mit pC und bis zu 16 % mit pA beladbar. Dreiviertel-Moleküle akzeptierten rund 35 % pC und 20 % pA. Wurde das Molekül aus heterologen Fragmenten zusammengesetzt, dann war die Akzeptorfähigkeit niedriger. Ganze tRNA-Moleküle, die nur einen Bruch in der Anticodon- oder hU-Schleife trugen, waren bei homologer Fragmentkombination stets zu 90 % beladbar. Wurde das Gesamt-Molekül aus Hälften zweier verschiedener tRNAs zusammengesetzt, dann waren die Beladungsergebnisse uneinheitlich: In einem Fall lagen die pN-Einbauwerte unter 50 %, in einem anderen dagegen bei 90 % und unterschieden sich somit nicht von der homologen Kombination. Feste Assoziation der heterologen Fragmente über Basenpaarung schien dabei keine notwendige Voraussetzung für die Beladbarkeit zu sein. Fünfviertel-tRNA-Moleküle mit überstehenden Sequenzbereichen ergaben sich in den untersuchten homologen und heterologen Fragment-Kombinationen als für pC sehr gut beladbar.

Aus den Ergebnissen ließen sich keine von der CCA-Transferase eindeutig bevorzugten Sequenzbereiche oder Strukturelemente der tRNAs erkennen.

Die enzymatische Reaktion in umgekehrter Richtung, d. h. den Abbau des pCpCpA-Endes der tRNAs verlief unvollständig.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Anreicherung der CCA-Transferase	4
2.1. Ergebnisse	4
2.1.1. Die 1. DEAE-Cellulose-Chromatographie	4
2.1.2. Die 2. DEAE-Cellulose-Chromatographie	7
2.1.3. Phosphor-Cellulose-Chromatographie	10
2.1.3.1. Einleitung	10
2.1.3.2. P-Cellulose-Säule im Anschluß an die 2. DEAE-Cellulose-Chromatographie (Weg 1)	10
2.1.3.3. P-Cellulose-Chromatographie im Anschluß an die 1. DEAE-Cellulose-Säule (Weg 2)	12
2.1.3.4. P-Cellulose-Säule als Rechromatographie (Weg 2)	12
2.1.4. Agarose-Biogel-Chromatographie	13
2.2. Diskussion der Präparation und der Eigenschaften der CCA-Transferase	14
3. Untersuchungen über die Wechselwirkung zwischen tRNA und CCA-Transferase aus Hefe mit Hilfe von Fragmenten von tRNA ^{Ser} und tRNA ^{Phe}	22
3.1. Einleitung	22
3.1.1. Beladung von Ser 36 - 82/83 allein und mit verschiedenen pG-Fragmenten kombiniert	24
3.1.1.1. Einleitung	24
3.1.1.2. pN-Einbau in Ser 36 - 82/83	24
3.1.1.3. pN-Einbau in die homologe Kombination Ser 36 - 82/83 und Ser 1 - 34	28
3.1.1.4. pN-Einbau in die heterologen Kombinationen Ser 36 - 82/83 und Phe 1 - 36 bzw. Phe 1 - 15	29
3.1.2. Beladung zweier von tRNA ^{Phe} abgeleiteter Fragmente und deren Kombinationen	32
3.1.2.1. Einleitung	32
3.1.2.2. pN-Einbau in Phe 34 - 74	33
3.1.2.3. pN-Einbau in Phe 34 - 74 mit verschiedenen pG-Fragmenten kombiniert	35

	Seite
3.1.2.4. pN-Einbau in Phe 17 - 73 allein und mit verschiedenen pG-Fragmenten kombiniert	37
3.2. Diskussion der Ergebnisse der Beladung der Fragmente mit pC und pA	39
4. Pyrophosphorolyse von tRNA mit Hilfe der CCA-Transferase	45
4.1. Einleitung	45
4.2. Ergebnisse	46
4.3. Diskussion	48
5. Experimenteller Teil	49
5.1. Anreicherung der CCA-Transferase	49
5.2. Aufschluß der Zellen	49
5.3. Streptomycinsulfat- und fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung	49
5.4. Basische Säulen	50
5.4.1. 1. DEAE-Cellulose-Chromatographie	50
5.4.2. 2. DEAE-Cellulose-Chromatographie (Weg 1)	50
5.5. Saure Säulen	50
5.5.1. P-Cellulose-Chromatographie im Anschluß an die 2. DEAE-Cellulose-Säule (Weg 1)	51
5.5.2. P-Cellulose-Chromatographie im Anschluß an die 1. DEAE-Cellulose-Säule (Weg 2)	51
5.5.3. P-Cellulose-Rechromatographie (Weg 2)	51
5.6. Agarose-Biogel-Chromatographie	51
5.7. 90fache Anreicherung der CCA-Transferase	52
5.8. Standard-Enzymtest, Definition der Enzym-Einheit	52
5.9. Bestimmung der ATPase-Aktivität	53
5.10. Bestimmung der Pyrophosphorylase-Aktivität	53
5.11. Bestimmung der Nuclease-Aktivität	54
5.12. Diskriminierende Beladung von tRNA-Fragmenten mit ^3H -CMP und ^{14}C -AMP	54
5.13. Abspaltung des 3'-terminalen pCpCpA-Endes: tRNA (PDE)	54
5.14. Bestimmung des maximalen pC- und pA-Einbaus in tRNA _{1,2} ^{Ser} (PDE)	55

	Seite
5. 15. Disk-Elektrophorese	55
5. 16. Pyrophosphorolyse unfraktionierter tRNA mit Hilfe der CCA-Transferase	55
5. 17. Reversible Denaturierung unfraktionierter tRNA	56
6. Materialien	57
6. 1. tRNA und tRNA-Fragmente	57
6. 2. Enzyme	58
7. Apparative Hilfsmittel	59
8. Zusammenfassung	60
9. Literaturverzeichnis	61

9. Literaturverzeichnis

1. The Genetic Code, 31. Cold Spring Harbor Sympos. Quantitat. Biol. (1966)
2. P. Lengyel und D. Söll, Bacteriological Reviews 33 (1969) 264
3. F. Lipmann, Science 164 (1969) 1024
4. H.G. Zachau, G. Acs und F. Lipmann, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 44 (1958) 885
5. J. Preiss, P. Berg, E.J. Ofengand, F.H. Bergmann und M. Dieckmann, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 45 (1959) 319
6. L.J. Hecht, M.L. Stephenson und P.C. Zamecnik, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 45 (1959) 505
7. S. Altman und J.D. Smith, Nature New Biol. 233 (1971) 35
8. L.J. Hecht, M.L. Stephenson und P.C. Zamecnik, Federation Proc. 17 (1958) 239
9. E. Schlimme, F.v.d. Haar, F. Eckstein und F. Cramer, Eur. J. Biochem. 14 (1970) 351
10. H. Bloemendal und L. Bosch, Biochim. Biophys. Acta 55 (1962) 269
11. M. Takanami, Biochim. Biophys. Acta 55 (1962) 132
12. M. Takanami, Biochim. Biophys. Acta 72 (1963) 237
13. M. Cannon, R. Krug und W. Gilbert, J. Mol. Biol. 7 (1963) 360
14. V. Daniel und U.Z. Littauer, J. Mol. Biol. 11 (1965) 692
15. M. Friedkin und A.L. Lehninger, J. Biol. Chem. 177 (1949) 775
16. E. Goldwasser, J. Am. Chem. Soc. 77 (1955) 6083
17. C. Heidelberger, E. Harbers, K.C. Leibman, Y. Takagi und V.R. Potter, Biochim. Biophys. Acta 20 (1956) 445
18. R. Logan, Biochim. Biophys. Acta 26 (1957) 227
19. E.S. Canellakis, Biochim. Biophys. Acta 23 (1957) 217
20. E. Herbert, V.R. Potter und L.J. Hecht, J. Biol. Chem. 225 (1957) 659
21. P.C. Zamecnik, M.L. Stephenson, J.F. Scott und M.B. Hoagland, Federation Proc. 16 (1957) 275
22. E.S. Canellakis, Biochim. Biophys. Acta 25 (1957) 217
23. M. Edmonds und R. Abrams, Biochim. Biophys. Acta 26 (1957) 226
24. E. Herbert, J. Biol. Chem. 231 (1958) 975
25. L.J. Hecht, P.C. Zamecnik, M.L. Stephenson und J.F. Scott, J. Mol. Biol. 233 (1958) 954
26. J. Preiss, M. Dieckmann und P. Berg, J. Biol. Chem. 236 (1961) 1748

27. J.J. Furth, J. Hurwitz, R. Krug und M. Alexander, J. Biol. Chem. 236 (1961) 3317
28. H.J. Gross, R.R. Duerinck und W.C. Fiers, Eur. J. Biochem. 17 (1970) 116
29. D.S. Carre, S. Litvak und F. Chapville, Biochim. Biophys. Acta 224 (1970) 371
30. J.P. Miller und G.R. Philipps, Biochem. Biophys. Res. Commun. 38 (1970) 1174
31. A.N. Best und G.D. Novelli, Arch. Biochem. Biophys. 142 (1971) 527
32. R. Giege und J.-P. Ebel, Biochim. Biophys. Acta 161 (1968) 125
33. R.W. Morris und E. Herbert, Biochemistry 9 (1970) 4819
34. H. Sternbach, F.v.d. Haar, E. Schlimme, E. Gärtner und F. Cramer, Eur. J. Biochem. 22 (1971) 166
35. J. Hurwitz und A.E. Bressler, J. Biol. Chem. 236 (1961) 542
36. E. Herbert, Ann. N.Y. Acad. Sci. 81 (1959) 679
37. E.S. Canellakis und E. Herbert, Biochim. Biophys. Acta 45 (1960) 133
38. V. Daniel und U.Z. Littauer, J. Biol. Chem. 238 (1963) 2102
39. C.W. Chung, H.R. Mahler und M. Enrione, J. Biol. Chem. 235 (1960) 1448
40. J.L. Starr und D.A. Goldthwait, J. Biol. Chem. 238 (1963) 682
41. D.D. Anthony, J.L. Starr, D.S. Kerr und D.A. Goldthwait, J. Biol. Chem. 238 (1963) 690
42. M.P. Deutscher, J. Biol. Chem. 247 (1972) 450
43. S.K. Mukerji und M.P. Deutscher, J. Biol. Chem. 247 (1972) 481
44. M.P. Deutscher, J. Biol. Chem. 247 (1972) 459
45. P. Yot, M. Pinck, A.-L. Haenni, H. Duranton und T. Chapeville, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 67 (1970) 1345
46. W.F. Anderson, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 62 (1969) 566
47. U.L. RajBhandary, A. Stuart, R.M. Hoskinson und H.G. Khorana, J. Biol. Chem. 243 (1968) 565
48. P. Lebowitz, P.L. Ipata, M.H. Makman, H.H. Richards und G.L. Cantoni, Biochemistry 5 (1966) 3617
49. V.M. Ingram und J.A. Sjöquist, Cold Spring Harbor Symp. Quantit. Biol. 28 (1963) 133
50. R. Rosset und R. Monier, Biochim. Biophys. Acta 108 (1965) 376

51. M. Cannon, Biochim. Biophys. Acta 87 (1964) 154
52. R. Rosset und R. Monier, Biochim. Biophys. Acta 108 (1965) 385
53. C. Scholtissek, Biochim. Biophys. Acta 61 (1961) 499
54. R. Rosset und R. Monier, Biochem. Biophys. Res. Commun.
10 (1963) 195
55. M. Cannon, Biochim. Biophys. Acta 129 (1966) 221
56. C.E. Holt, P.B. Joel und E. Herbert, J. Biol. Chem.
241 (1966) 1819
57. H. Overath, F. Fittler, K. Harbers, R. Thiebe und H.G. Zachau,
FEBS Letters 11 (1970) 289
58. H. Honda, Biochim. Biophys. Acta 195 (1969) 587
59. B. Rether und J.-P. Ebel, persönliche Mitteilung
60. R. Hirsch und H.G. Zachau, noch unveröffentlicht
61. J.A. Carbon, Biochim. Biophys. Acta 95 (1965) 550
62. T. Lindahl, A. Adams, M. Geroch und J.R. Fresco, Proc. Natl.
Acad. Sci. U.S. 57 (1967) 178
63. P. Cerutti, Biochem. Biophys. Res. Commun. 30 (1968) 434
64. H.G. Zachau, D. Dütting und H. Feldmann, Z. Physiol. Chem.
347 (1966) 212
65. J. Kruppa und H.G. Zachau, Biochim. Biophys. Acta, im Druck
66. A.D. Mirzabekov, D. Lastity, E.S. Levina und A.A. Bayev,
FEBS Letters 7 (1970) 95
67. F. Fittler und H.G. Zachau, in Vorbereitung
68. F. Fittler und R. Römer, unveröffentlicht.
69. U.L. RajBhandary, S.H. Chang, A. Stuart, R.D. Faulkner,
R.M. Hoskinson und H.G. Khorana, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.
57 (1967) 751
70. W. Wintermeyer, Dissertation, München 1972
71. K. Harbers, Dissertation, München 1971
72. K. Harbers, R. Thiebe und H.G. Zachau, Eur. J. Biochem.
26 (1972) 132-152
73. U.J. Hänggi, R.E. Streeck, H.P. Voigt und H.G. Zachau,
Biochim. Biophys. Acta 217 (1970) 278
74. A. Adams, T. Lindahl und J.R. Fresco, Proc. Natl. Acad. Sci.
U.S. 57 (1967) 1684
75. H. Sternbach, persönliche Mitteilung

76. E.A. Peterson, "Cellulosic Ion Exchangers" in "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology" S.287-290, North Holland Publ. Comp., Amsterdam-London
77. K. Takahashi, J. Biochem. (Tokyo) 49 (1961) 1
78. R. Thiebe, Dissertation, Köln 1965
79. G. Zubay und M. Takanami, Biochem. Biophys. Res. Commun. 15 (1964) 207
80. W.E. Razzell, Methods in Enzymology 6 (1963) 236
81. P. Philippsen und H.G. Zachau, Biochim. Biophys. Acta, im Druck
82. F. Melchers, D. Dütting und H.G. Zachau, Biochim. Biophys. Acta 108 (1965) 182
83. R.J. Hilme, persönliche Mitteilung an H.G. Zachau
84. A. Garen und C. Levinthal, Biochim. Biophys. Acta 38 (1960) 470
85. D.E. Hughes, British J. of Experimental Pathology 32 (1951) 97
86. S.A. Berry und M. Grunberg-Manago, Biochem. Biophys. Res. Commun. 39 (1970) 691

Lebenslauf

Am 6. Februar 1940 wurde ich als dritter Sohn des Kaufmanns Albert Overath und seiner Frau Gerda, geb. Roessler, in Nürnberg geboren. Nach dem Besuch verschiedener Volks- und Oberschulen begann ich Ende 1954 eine kaufmännische Lehre in Nürnberg, die ich 1957 beendete. Darauf folgte eine einjährige Ausbildung an der Textildachschule Münchberg/Obfr.. Zwischen den Jahren 1959 und 1963 erwarb ich am Abendgymnasium in München nebenberuflich das Reifezeugnis. Ende 1963 immatrikulierte ich mich an der Universität München für das Fach Chemie und absolvierte 1967 und 1969 das Vor- und Hauptdiplom-Examen. Seit September 1969 arbeite ich am Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München an meiner Diplom- und Doktorarbeit.

